

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Estudio preclínico y clínico de la seguridad y actividad
antihipertensiva de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá)**

TESIS

para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Juan Pedro Rojas Armas

Lima - Perú

2009

A mi adorada familia por su constante apoyo:

- ✓ *Mis padres: Felipe y Cornelia*
- ✓ *Mis hijos: John Christian y Gina Patricia*
- ✓ *Mis hermanos: Betty y Aníbal*
- ✓ *Mis sobrinos: Miguel y Mathías*

*Con profundo afecto, admiración y
gratitud a mi maestro y asesor de la
tesis:*

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo

Miembros de jurado:

Presidenta: Dra. Eloisa Hernández Fernández

Miembros: Dra. Nancy Lozano Reyes

Dr. Jorge Arroyo Acevedo

Dr. Ernesto Ráez Gonzales

Dr. Robert Palomino de la Gala

Sumario

| | |
|----------------------------------|-------|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Introducción | 4 |
| 2. Generalidades o Marco Teórico | 6 |
| 3. Material y Métodos | 9 |
| 4. Resultados | 23 |
| 5. Discusión | 41 |
| 6. Conclusiones | 51 |
| 7. Referencias Bibliográficas | 52 |
| 8. Anexo | 66-67 |

Estudio preclínico y clínico de la seguridad y actividad antihipertensiva de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá)

Resumen

El objetivo fue determinar la seguridad y eficacia antihipertensiva en animales y seres humanos del extracto etanólico de las hojas, jugo del fruto y fracción metanólica del jugo de *Passiflora edulis*. La seguridad en animales vía oral se hizo a dosis única en ratones albinos y a dosis repetidas durante 28 días en ratas Holtzman; la actividad antihipertensiva se evaluó en ratas hipertensas por L-NAME; el posible mecanismo de acción antihipertensivo se determinó evaluando la diuresis en ratas, cuantificando los niveles de óxido nítrico en sangre de ratas, y actividad antioxidante in Vitro con DPPH; el estudio clínico fase II se realizó en pacientes voluntarios con diagnóstico definitivo de hipertensión arterial estadio 1 y bajo criterios éticos. Los resultados indicaron una dosis letal 50 (DL₅₀) sobre 2000 mg/kg para el extracto de hojas y jugo del fruto de *P. edulis* por lo que son sustancias no tóxicas; y en el ensayo de toxicidad a dosis repetidas, el extracto metanólico de las hojas mostró cambios ligeramente por encima de los valores permitidos de alanina aminotransferasa, histológicamente la mayoría de órganos se encontraron normales y sólo dos casos mostraron cambios en hígado y riñón relacionados con proceso inflamatorio y congestión vascular; los productos de la planta analizados disminuyeron hasta en 17% la presión arterial sistólica en ratas hipertensas, lo que se explicaría por haberse demostrado efecto diurético ($p < 0.02$), incremento de óxido nítrico ($p < 0.005$) y capacidad antioxidante ($p < 0.01$); el jugo del fruto de *P. edulis* disminuyó en 6.73 mmHg y 5.33 mmHg la presión sistólica y la presión diastólica respectivamente en comparación al grupo placebo y sin efectos adversos. Concluyéndose que en las condiciones experimentales el jugo del fruto de *P. edulis* ha evidenciado ser seguro y tener efecto antihipertensivo en ratas hipertensas y pacientes con hipertensión estadio 1.

Palabras clave: *Passiflora edulis*, maracuyá, antihipertensivo, diurética, antioxidante.

Preclinical and clinical studies for safety and antihypertensive activity of *Passiflora edulis* Sims (passion fruit)

Abstract

The purpose was to determine the safety and antihypertensive efficacy in animals and humans of the ethanol extract of the leaves, fruit juice and methanolic fraction of the juice of *Passiflora edulis*. Security in animals orally was a single dose in albino mice and repeated doses during 28 days in Holtzmann rats, the antihypertensive activity was evaluated in hypertensive rats by L-NAME, and the possible antihypertensive mechanism of action was noting diuresis in rats quantifying levels of nitric oxide in blood of rats and in vitro antioxidant activity with DPPH, the phase II clinical study was performed in volunteer patients with definite diagnosis of hypertension and low ethical criteria. The results indicate a lethal dose 50 (LD₅₀) of 2000 mg/kg for leaves and extract juice from the fruit of *P. edulis* ranking as no toxic substances, and repeated dose toxicity of the extract of leaves showed changes in alanine aminotransferase slightly above the allowable values, histologically, the majority of organs were normal and only two cases showed changes in liver and kidney-related process inflammatory and vascular congestion, products of the plant analyzed decreased up to 17% the systolic blood pressure in hypertensive rats have been shown to be explained by diuretic effect ($p < 0.02$), increased level nitric oxide ($p < 0.005$) and antioxidant capacity ($p < 0.01$), the juice of the fruit of *P. edulis* decreased by 6.73 mmHg and 5.33 mmHg systolic pressure and diastolic pressure respectively compared to the placebo group and no adverse effects. Concluded that under the experimental conditions the juice from the fruit of *P. edulis* has been shown to be safe and have antihypertensive effect in hypertensive rats and patients with mild hypertension.

Keywords: *Passiflora edulis*, passion fruit, antihypertensive, diuretic, antioxidant.

Pré-clínicos e estudos da atividade anti-hipertensivos e segurança de *Passiflora edulis* Sims (maracujá)

Abstract

O objetivo foi determinar a segurança e a eficácia antihipertensivos em animais e seres humanos do extrato etanólico das folhas, suco do frutos e fração metanólica do suco de *Passiflora edulis*. Segurança em animais por via oral foi de uma única dose, em camundongos albinos e de doses repetidas durante 28 dias em ratos Holtzman, a actividade anti-hipertensiva foi avaliada em ratos hipertensos por L-NAME, eo possível mecanismo de ação antihipertensivo foi observando a diurese em ratos, quantificação os níveis de óxido nítrico no sangue de ratos e in vitro atividade antioxidante com DPPH, o estudo clínico fase II foi realizado em pacientes voluntários com diagnóstico definitivo de hipertensão arterial e baixo padrões éticos. Os resultados indicam uma dose letal 50 (DL₅₀) sobre 2000 mg/kg do extrato das folhas o sumo de frutos de *P. edulis* qualificándoseles como substâncias não tóxicas, e toxicidade por dose repetida do extrato de folhas mostrou mudanças no ALT ligeiramente acima dos valores admissíveis, histologicamente, a maioria dos órgãos eram normais e apenas dois casos apresentaram alterações no fígado e rim relacionados com processo inflamatórias e congestão vascular; os produtos da planta analisado diminuiu para 17% a pressão arterial sistólica em ratos hipertensos que poderia ser explicado pelo efeito diurético tem sido demonstrada ($p < 0,02$), aumento de óxido nítrico ($p < 0,005$) e capacidade antioxidante ($p < 0,01$), o sumo de frutos de *P. edulis* diminuiu 6,73 mmHg e 5,33 mmHg de pressão sistólica e a pressão diastólica, respectivamente, em comparação com o grupo placebo e nenhum efeito adverso. Concluiu que, nas condições experimentais do sumo do fruto de *P. edulis* demonstrou ser segura e tem efeito anti-hipertensivos em ratos hipertensos e pacientes com hipertensão leve.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*, maracujá, anti-hipertensivos, diuréticos, antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular continúa siendo la causa más común de muerte en los países industrializados, y la hipertensión arterial es el factor de riesgo tratable más frecuente. La prevalencia de hipertensión arterial en Europa está en promedio en 42,2%, siendo más alta en Alemania (55%), seguido por Finlandia (49%), España (47%), Inglaterra (42%), Suecia (38%) e Italia 37%, mientras que en Norte América se encontró que está en promedio en 27,6% (¹, ²). En la región de las Américas esta prevalencia se considera que oscila entre el 10 y 25% de los adultos (³). En el Perú se ha reportado en el año 2004, en un estudio realizado en 26 ciudades, una prevalencia de hipertensión de 23.7%, variando según la región; así en la costa fue 27.3%; en la sierra 18.8% y 22.1% en las altitudes menores y mayores de 3000 msnm, respectivamente; en la selva, 22.7% (⁴).

El tratamiento de la hipertensión arterial, debido a que es una enfermedad crónica, conlleva el uso prolongado de fármacos con diversos grados de reacciones adversas que incluyen sedación, trastornos de la concentración mental, hipotensión, insuficiencia renal aguda, hipercalcemia, tos seca acompañada algunas veces de sibilancia, angioedema, etc (⁵); por lo que es necesario la búsqueda de nuevas fuentes terapéuticas con menor riesgo, siendo el reino vegetal una alternativa.

El uso de *Passiflora* como una medicina fue elogiado por primera vez por un investigador español en el Perú en 1569 (⁶). La información etnofarmacológica revela que *Passiflora edulis* Sims se ha utilizado en medicina tradicional en diversas partes del mundo. En Portugal, el fruto de *Passiflora edulis* es considerado como un estimulante digestivo y es usado como un remedio para el carcinoma gástrico; en la India, las hojas frescas de esta planta son hervidas en pequeña cantidad de agua y el extracto es bebido para el tratamiento de disentería e hipertensión, y los frutos son comidos para el alivio de la constipación (⁷); en Sudamérica, se bebe la infusión de hojas y flores como sedante, la infusión de las partes aéreas se utiliza en el tratamiento de tétanos, epilepsia, insomnio e hipertensión (⁸), además se indica como relajante

muscular ⁽⁹⁾, diurético, para tratar dolores estomacales, tumores intestinales y fiebre ⁽¹⁰⁾.

El estudio fitoquímico de *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) demuestra la presencia de glucósidos; entre ellos passiflorina ⁽¹¹⁾, glucósidos flavonoides: luteolina-6-C-chinovósido ⁽¹²⁾, glucósidos cianogénicos ^(13, 14, 15); alcaloides: harman ⁽¹⁶⁾; triterpenos y saponinas ⁽¹⁷⁾; antocianinas ⁽¹⁸⁾, eugenol ⁽¹⁹⁾, γ -lactonas, fenoles, caroteno, ácido L-ascórbico, ésteres, aceites volátiles, aminoácidos, carbohidratos, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, calcio, hierro y fósforo ⁽²⁰⁾.

La búsqueda de fuentes terapéuticas en el reino vegetal constituye una alternativa viable. *Passiflora edulis* (maracuyá) es un recurso natural abundante en el Perú y fácilmente cultivable en costa y selva. El único estudio publicado sobre actividad antihipertensiva de esta planta fue ejecutado en el Japón por Ichimura et al., 2006 ⁽²¹⁾ y fue realizado con el extracto de la corteza. No existe al presente ningún estudio de las hojas o el jugo del fruto de *Passiflora edulis* en relación al efecto antihipertensivo de esta planta o de algún componente aislado de ella, por lo que basado en los antecedentes mencionados y los datos etnofarmacológicos, se propuso realizar esta investigación, para lo cual se planteó como objetivos: 1) Determinar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en *Passiflora edulis*; 2) Determinar la seguridad de la administración oral de *P. edulis*, en los modelos de toxicidad aguda y de dosis repetidas. 3) Determinar la actividad antihipertensiva del extracto etanólico de las hojas, jugo del fruto y fracción metanólica del jugo de *P. edulis* en ratas; 4) Establecer el posible mecanismo de acción antihipertensivo de *P. edulis*, evaluando la actividad diurética, niveles de óxido nítrico, y la actividad antioxidante; y, 5) Determinar la eficacia y seguridad antihipertensiva coadyuvante del jugo del fruto de *P. edulis* en pacientes con diagnóstico definitivo de hipertensión arterial leve.

2. GENERALIDADES O MARCO TEORICO

2.1 Hipertensión arterial

La Hipertensión arterial es una enfermedad sistémica que consiste en la elevación crónica de la presión arterial por encima de los valores normales. Se considera Hipertensión Arterial (HTA) cuando las cifras de presión arterial sistólica (PAS) son iguales o mayores de 140 mmHg y la presión arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg. Según el JNC7 (The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure), la presión sanguínea en adultos se clasifica de acuerdo a los valores de PAS y PAD en: normal (PAS < 120 mmHg y PAD < 80 mmHg); prehipertensión (PAS = 120-139 mmHg o PAD = 80-89 mmHg); hipertensión estadio 1 (PAS = 140-159 mmHg o PAD = 90-99 mmHg); y, hipertensión estadio 2 (PAS ≥ 160 mmHg o PAD ≥ 100 mmHg) ⁽²²⁾.

Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la hipertensión esencial: el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático, tal vez relacionado con excesiva exposición o respuesta al estrés psicosocial del impacto de la vida moderna; la sobreproducción de hormonas ahorradoras de sodio y vasoconstrictoras; la alta ingesta de sodio; la inadecuada ingesta de potasio y calcio; el incremento en la secreción o la inapropiada actividad de la renina, con resultante incremento en la producción de angiotensina II y aldosterona (SRAA); la deficiencia de vasodilatadores, tales como la prostaciclina, el óxido nítrico y los péptidos natriuréticos; la alteración en la expresión del sistema kininakalikreína, que afecta el tono vascular y el manejo renal del sodio; las anomalías en los vasos de resistencia, incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la remodelación vascular y la reducción de la complacencia, pueden anteceder a la hipertensión y contribuir a su patogénesis ⁽²³⁾.

Se considera como causas identificables de hipertensión arterial: enfermedad renal crónica, coartación de la aorta, síndrome de Cushing y otros estados de exceso de glucocorticoides incluyendo terapia esteroide crónica, causas

relacionadas o inducidas por drogas (cocaína, anfetamina, simpaticomiméticos, drogas antiinflamatorias no esteroideas, hormonas contraceptivas orales, hormonas esteroideas adrenales, ciclosporina y tacrolimus, eritropoyetina, etc), uropatía obstructiva, feocromocitoma, aldosterismo primario y otros estados de exceso de mineralcorticoides, hipertensión renovascular, apnea del sueño, y enfermedad tiroidea o paratiroidea ⁽²²⁾.

Los órganos blanco que pueden ser dañados por la hipertensión arterial son: corazón (hipertrofia ventricular izquierda, angina o infarto miocárdico previo, revascularización coronaria previa, insuficiencia cardiaca), cerebro (ataque fulminante o ataque isquémico transitorio, demencia), enfermedad renal crónica, enfermedad arterial periférica, retinopatía. El tratamiento de la hipertensión ha sido asociado con cerca de 40% de reducción del riesgo de ataque fulminante y cerca de 15% de reducción del riesgo de infarto de miocardio ⁽²⁴⁾, pero aunque se ha demostrado que el tratamiento de la hipertensión previene la enfermedad cardiovascular y alarga la vida, la hipertensión arterial permanece inadecuadamente manejada en todas partes ⁽²⁵⁾.

2.2 *Passiflora edulis* Sims (maracuyá)

El género *Passiflora*, comprende cerca de 500 especies, siendo el más grande en la familia Passifloraceae, las cuales están distribuidas en regiones cálidas y tropicales del Nuevo Mundo; son mucho más raras en Asia, Australia y África tropical. Varias especies son cultivadas en los trópicos por sus frutos comestibles, los más ampliamente cultivados son *Passiflora edulis* Sims ⁽⁶⁾.

Passiflora edulis Sims es una planta originaria de la amazonía brasileña, conocida con el nombre común de maracuyá, parchita, calala, maracujá, yellow passion-fruit ⁽²⁶⁾. La palabra maracuyá proviene del portugués-brasileño maracuya, de origen indígena que significa “Comida preparada en Totuma” ⁽²⁷⁾. Es una especie cultivada ampliamente en países tropicales y subtropicales y existen dos variedades: *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*, cuyos frutos son amarillos, crece desde el nivel del mar hasta 1000 msnm; y, *Passiflora edulis*

Sims var. purpurea, con frutos color púrpura y que se adapta a zonas altas por encima de 1200 msnm. ⁽²⁸⁾. Se caracteriza por ser una planta leñosa perenne de hábito trepador y de rápido desarrollo que puede alcanzar hasta 10 m de largo; las hojas son simples, alternas, con estipulas y un zarcillo en la axila, con márgenes aserrados; las flores son solitarias y axilares, fragantes y vistosas; el fruto es una baya esférica, globosa o elipsoide que mide hasta 10 cm de diámetro y pesa hasta 190 g, de color amarillo o purpúreo, con una pulpa muy aromática ⁽²⁹⁾.

Las investigaciones farmacológicas realizadas con *P. edulis* han demostrado que posee diversas propiedades. El extracto del fruto inhibió las enzimas que tienen actividad de endopeptidasas dependientes de zinc, las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP-2 y MMP-9 involucradas en la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis ⁽³⁰⁾, así como también inhibió la transformación neoplásica de células murinas 3T3 BALB/c tratadas con benzopireno ⁽³¹⁾; el extracto de las hojas disminuyó la inflamación aguda y aumentó la proliferación fibroblástica, la colagenización y la neoformación capilar en la cicatrización de la vejiga de ratas ⁽³²⁾; también mostró una significativa actividad antiinflamatoria sobre pleuresía inducida por carragenina en ratones ^(33, 34); además aumentó significativamente el número de ratones protegidos contra convulsiones inducidas por estricnina, de manera semejante al clonazepam ⁽³⁵⁾; y tuvo actividad antiviral contra herpes virus simple tipo 1, HSV-1 ⁽³⁶⁾. Por otra parte, se ha aislado un péptido antifúngico en las semillas de *P. edulis* ⁽³⁷⁾.

Respecto a la actividad de los extractos de *P. edulis* sobre el SNC existe información controversial. Algunos estudios demostraron efecto sedante ⁽³⁵⁾, ansiolítico ^(38, 39), tipo ansiolítico sin alterar la actividad motora ⁽⁴⁰⁾, tipo ansiolítico sin alterar el proceso de memoria ⁽⁴¹⁾, y calmante tipo tranquilizante mayor ⁽⁴²⁾; sin embargo, otros investigadores afirmaron que no posee efecto ansiolítico ⁽⁴³⁾, ni efecto hipnótico-sedante, más bien mostró efecto depresor no específico del SNC ⁽⁴⁴⁾.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

- *Passiflora edulis* Sims (maracuyá): hojas y fruto
- Ratones albinos (hembras y machos), de 3 meses de edad, pesando 30 ± 5 g.
- Ratas albinas Holtzmann (hembras y machos), de 3 meses de edad, pesando 300 ± 50 g.
- Pacientes con diagnóstico definitivo de hipertensión leve (hombres y mujeres), de 45-80 años de edad.

3.1.2 Equipos:

- Medidor de presión sanguínea LE5002 (Letica[®])
- Liofilizador ALPHA 1-2 (CHRIST)
- Rotavapor Büchi[®]
- Estufa (Mettler[®])
- Horno de aire circulante
- Centrífuga (internacional Equipment Co[®])
- Columna cromatográfica
- Lámpara UV
- Balanzas analíticas sensibles a 1 g (Hanna[®]); 0.1 y 0.00001 g (Bennet[®])
- Molino eléctrico de cuchillas (Willey Hill[®])
- Espectrofotómetro UV-VIS (Labo Med[®])
- Cepo para ratas
- Sonda de administración orogástrica
- Microscopio óptico (Nikon[®])
- Micrótopo American Optical modelo 815
- Equipo de disección
- Tensiómetro de mercurio modelo TXJ-10
- Electrocardiógrafo Fukuda[®].

3.1.3 Material de laboratorio:

- Vasos de precipitación
- Probetas
- Matraces
- Cápsula de porcelana
- Jeringas descartables
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Fiolas
- Cápsulas de gelatina 00

3.1.4 Drogas y reactivos

- Reactivo de Liebermann-Buchard
- Cloruro férrico (Merck[®])
- Reactivo de Shinoda
- Hidróxido de sodio (Merck[®])
- Ácido clorhídrico (Merck[®])
- Hidróxido de amonio (Merck[®])
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Metanol (Fisher[®])
- Etanol (Fisher[®])
- Cloroformo (Merck[®])
- Silicagel G60 (Merck[®])
- Zinc metálico. (Merck[®])
- N-I-naftil-etilendiamina (Sigma[®])
- Ácido sulfanílico 1 % (Sigma)
- L-NAME (Sigma[®])
- Captopril 100 mg (Capoten[®])
- Furosemida 20 mg (Lasix[®])
- Enalapril 10 mg (Lotrial[®])
- 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (Sigma[®])

- Dióxido de silicio (Aerosil®)
- Celulosa microcristalina (Sigma®)
- Almidón (Sigma®)
- Formol 40% (Diquimsa®)

3.2 METODOLOGIA

Las diversas pruebas se ejecutaron desde junio de 2004 hasta noviembre de 2007. Para el estudio en animales de experimentación e in vitro se utilizaron los laboratorios Farmacología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNMSM y del Departamento de Farmacotecnia y del Instituto de Investigaciones de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; para el estudio clínico se utilizó el Hospital Dos de Mayo de Lima, el hospital Belén de Trujillo y los Centros de Salud de Moche y Laredo de la ciudad de Trujillo.

3.2.1. Recolección, identificación y preparación de la muestra

Las hojas y el fruto maduro de *Passiflora edulis* Sims fueron recolectados en el Distrito de Moche, Provincia de Trujillo, Departamento de la Libertad, Perú ⁽⁴⁵⁾ en junio del 2004 y 2006. Una parte de la planta con hojas y flor fue llevada al Museo de Historia Natural de la UNMSM para la identificación taxonómica.

El jugo fue obtenido del fruto maduro y se pasó por un colador para separarlo de las semillas, finalmente se filtró utilizando papel de filtro rápido con poros de 4.7 – 4.6 micras y se liofilizó a -45°C y 100 atmósferas de presión durante 24 horas. El polvo liofilizado fue utilizado para la obtención de la fracción metanólica y para la elaboración de cápsulas para el estudio clínico.

Las hojas fueron desecadas a 38°C en un horno con aire circulante en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Los extractos etanólico y metanólico de las hojas fueron preparados según la técnica del CYTED, 1995 ⁽⁴⁶⁾. El material seco y pulverizado de las hojas fue macerado con etanol al 96% o con metanol durante 72 horas a temperatura

ambiente. Se filtró a través de filtro rápido (poros de 4.7 – 4.6 micras) y el filtrado se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor®). El residuo fue disuelto en agua y liofilizado a -45°C y 100 atmósferas de presión durante 24 horas. El liofilizado fue conservado en un frasco color ámbar a 4°C hasta su uso.

Para obtener la fracción metanólica del jugo, se utilizó una columna cromatográfica con silicagel G60 donde el liofilizado del jugo fue sometido al pasaje de 4 solventes de polaridad creciente: cloroformo, metanol, etanol y agua ⁽⁴⁷⁾.

3.2.2 Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios ^(47, 48)

A una solución acuosa de la muestra (5 mg/mL), se realizó las siguientes pruebas:

a) Determinación de saponinas

Prueba de la espuma

A una solución acuosa de la muestra conteniendo 5 mg/mL, se sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de la saponina se manifestó por la formación de una espuma persistente durante 3 min.

Reactivo de Liebermann – Buchard

A una pequeña cantidad de la muestra se añadió unas pocas gotas de ácido acético más 3 mL de anhídrido acético/H₂SO₄(50:1), con lo cual las saponinas triterpenoidales dan color rosado a púrpura, mientras las esteroidales dan azul – verdoso .

b) Determinación de taninos

Con gelatina – cloruro de sodio: A 1 mL de muestra se agregó 3 gotas de reactivo, en un principio se forma en la solución una sustancia en forma de nube, luego de centrifugar queda en el fondo un precipitado de color blanco. Este confirma la presencia de taninos.

Con Cloruro Férrico o Alumbre férrico: A la muestra se agregó unas gotas de cloruro férrico o alumbre férrico; una coloración negra azulada nos indica que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico, mientras que la coloración verde nos indica que deriva de la catequina.

c) Determinación de flavonoides

Con R. Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añadió 3 gotas de HCl concentrado. Se observó un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color anaranjado intenso. Lo que indica un resultado positivo.

d) Determinación de cumarinas

Se colocó 2 gotas de la muestra en una tira de papel Whatman o algodón y añadió sobre ella una gota de NaOH 10 %. La observación de fluorescencia verde amarillenta bajo la lámpara UV 365 nm indica la presencia de cumarinas fijas.

e) Determinación de quinonas

Se pesaron dos gramos de muestra y se trituro hasta un polvo muy fino en un mortero, luego se realizarán los siguientes ensayos químicos:

Solubilidad en NaOH al 5%

En un tubo de ensayo se introdujeron 10 mg de la muestra, se añadió 0,2 mL de etanol y 0,4 mL de NaOH al 5%. El cambio de coloración nos indicó la presencia de compuestos quinónicos.

Reacción de Bornträger

Un gramo de muestra se trató con NaOH 5% en caliente, se filtró, enfrió y se aciduló con HCl 20%, se añadió benceno, agitó y se dejó en reposo. Luego se separó la fase bencénica a la cual se le añadió NH_4OH .

La formación de una coloración rosada a roja, indicó la presencia de antraquinonas. Fue necesario dejar un buen tiempo, para que la reacción ocurra.

f) Determinación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff.

Se disolvió 8g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 y mezcló con 50 mL de una solución acuosa conteniendo 27,2 g de KI, se dejó reposar la solución, decantó el sobrenadante y diluyó a un volumen de 100 mL. Al agregar unas cuantas gotas de este reactivo a una solución ácida de la muestra se observó la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo.

Reactivo de Mayer.

Se disolvió 1,36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y se adicionó 10 mL de una solución conteniendo 5 g de KI y se diluyó hasta un volumen de 100mL. Al agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada de la muestra se observa la aparición de un precipitado de blanco a crema.

3.2.3 Evaluación de la seguridad en animales

3.2.3.1 Toxicidad aguda oral: determinación de la DL50

Se utilizaron 120 ratones albinos de 18-22 g de peso corporal, adquiridos del Instituto Nacional de Salud. Después de una semana de aclimatación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 12 grupos (n=10), según el método de Vega y Carrillo, 1997 ⁽⁴⁹⁾, según el siguiente diseño experimental.

Grupo 1 (n=10): 2500 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 2 (n=10): 5000 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 3 (n=10): 7500 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 4 (n=10): 10000 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 5 (n=10): 12500 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 6 (n=10): 15000 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 7 (n=10): 17500 mg/kg de extracto etanólico de las hojas

Grupo 8 (n=10): 2500 mg/kg de liofilizado del jugo del fruto

Grupo 9 (n=10): 5000 mg/kg de liofilizado del jugo del fruto
Grupo 10 (n=10): 10000 mg/kg de liofilizado del jugo del fruto
Grupo 11 (n=10): 15000 mg/kg de liofilizado del jugo del fruto
Grupo 12 (n=10): 20000 mg/kg de liofilizado del jugo del fruto

Previo ayuno de 4 horas, se administró por vía oral a los primeros 7 grupos, el extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* en dosis única de 2500, 5000, 7500, 10000, 12500, 15000 y 17500 mg/kg; los restantes 5 grupos recibieron liofilizado del jugo del fruto en dosis única de 2500, 5000, 10000, 15000 y 20000 mg/kg. Los animales fueron observados individualmente después de la dosificación al menos una vez durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 horas, con especial atención durante las primeras 4 horas, y diariamente de allí en adelante, por un total de 14 días. Las observaciones de signos tóxicos se registraron sistemáticamente e incluyeron cambios en la piel y pelaje, ojos y membranas mucosas, y también sistema respiratorio, sistema nervioso autónomo y SNC, actividad somatomotora y patrón de comportamiento. La atención estuvo dirigida a observaciones de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño, coma y muerte. Al finalizar este periodo, se procedió al sacrificio por tracción de la nuca, para hacer la necropsia; se efectuó examen macroscópico de órganos y tejidos; además se extrajeron: corazón, riñón, bazo, pulmón e hígado para la determinación de su peso relativo. El peso corporal se controló al inicio, a los 7 días, y al final del experimento. Se registraron el número de animales muertos en cada grupo y se calculó la dosis letal 50 (DL₅₀) con el método de los Probits.

3.2.3.2 Toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días

El procedimiento se realizó según lo estipulado en el ensayo 407 de las directrices de la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) ⁽⁵⁰⁾. Se utilizaron 20 ratas Holtzman (10 de cada sexo), con un peso promedio de 250 g; los animales fueron sometidos a un período de aclimatación de 5 días. El día antes del inicio del ensayo se conformaron los 2 grupos experimentales de 10 animales (5 de cada sexo). Un grupo fue control

(I), al cual se le administró vehículo (agua destilada) y el otro fue grupo tratado (II) al cual se le administró extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* en dosis de 200 mg/kg una vez/día vía oral durante 28 días, según el siguiente diseño:

Grupo control (I): 5 machos y 5 hembras → agua destilada

Grupo tratado (II): 5 machos y 5 hembras → ext. met. de hojas: 200 mg/kg vo
1 v/d durante 28 d.

Se realizaron diariamente observaciones clínicas a los animales, las mismas que incluyeron fundamentalmente cambios en la piel y el pelaje, ojos, membranas mucosas, ocurrencia de secreciones y excreciones, actividad autonómica (ej. lacrimación, piloerección, tamaño de pupila, patrón respiratorio inusual). Cambios en el paso, postura, y respuesta a la manipulación, también como la presencia de movimientos tónicos o clónicos, estereotipias (ej. acicalamiento excesivo, dar vueltas repetitivas) o comportamiento extraño (ej. automutilación, caminar hacia atrás). En la cuarta semana de exposición, la reactividad sensoria a los diferentes tipos de estímulos (ej. estímulo auditivo, visual y propioceptivo), evaluación de la fuerza de agarre y evaluación de la actividad motora.

Los animales se pesaron al inicio del estudio y los días 7, 14, 21 así como al terminar el mismo. Al finalizar el estudio se promedió el peso de los animales por semana y grupo, teniendo en cuenta el sexo para observar cómo se comportó este parámetro durante el ensayo.

Las determinaciones hematológicas y de bioquímica clínica se llevaron a cabo a los 28 días de exposición del extracto. La obtención de sangre se realizó por punción cardiaca previo ayuno de 12 h de los animales. Se determinó el hemograma, alanino aminotransferasa (ALAT), glucosa, colesterol total y triglicéridos.

Al finalizar el tratamiento, todos los animales fueron eutanizados con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Los animales fueron sometidos a necropsia grosera completa, lo cual incluyó examen cuidadoso de

la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Corazón, pulmones, riñones, bazo, hígado, ovario o testículos fueron extraídos, separados de tejido adherente y pesados. Estos órganos fueron fijados en formol al 10%, embebidos en parafina, coloreados con Hematoxilina Eosina y se les realizó el estudio microscópico correspondiente.

3.2.4 Determinación de la actividad antihipertensiva en ratas

Se utilizaron ratas macho raza Holtzman, con peso de 220 ± 20 g, que fueron adquiridas del Instituto Nacional de Salud. Los animales fueron distribuidos al azar en 5 grupos ($n = 6$). Después de una semana de aclimatación, se procedió a medir la presión arterial (basal, D0) en la cola de las ratas con el aparato LE 5002 Letica[®], el cual está equipado con un microprocesador específicamente diseñado para realizar mediciones indirectas de la presión sanguínea en animales de experimentación. Enseguida se indujo hipertensión arterial en 5 grupos mediante la administración de L-NAME (N_G-nitro-L-arginina metil éster) (Sigma[®]) en dosis de 50 mg/kg/día v.o. durante 10 días, según el método de Pereira et al., 2004 ⁽⁵¹⁾. El primer grupo recibió L-NAME más agua destilada; el segundo grupo recibió L-NAME más extracto etanólico de las hojas por vía oral en dosis de 500 mg/kg/día; el tercer grupo recibió L-NAME más liofilizado del jugo de *P. edulis* en dosis de 500 mg/kg/día v.o; el cuarto grupo recibió L-NAME más fracción metanólica del jugo del fruto en dosis de 100 mg/kg/día v.o; el quinto grupo recibió L-NAME más captopril en dosis de 100 mg/kg/día v.o, según el siguiente diseño.

Grupos: $n = 6$

1. **L-NAME:** L-NAME 50 mg/kg 1v/d x 10 d.
2. **Hojas:** L-NAME + extracto etanólico de hojas 500 mg/kg 1v/d x 8 d.
3. **Jugo:** L-NAME + liofilizado del jugo del fruto 500 mg/kg 1 v/d x 8 d.
4. **Fraccción:** L-NAME + fracción metanólica de jugo 100 mg/kg 1v/d x 8 d.
5. **Captopril:** L-NAME + captopril 100 mg/kg 1 v/d x 8 d.

El tratamiento con las sustancias de prueba y captopril comenzó 2 días después de haber iniciado la administración de L-NAME (D2) y se continuó hasta el final del experimento. La presión arterial se siguió midiendo en el día 3, 4, 7 y 10 (D3, D4, D7 y D10, respectivamente). Se registraron datos de

presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Para la medición de la presión arterial fue necesario el establecimiento de condiciones estrictas: el ambiente se mantuvo libre de ruidos que pudieran perturbar la tranquilidad de las ratas, los animales fueron tratados y colocados en el cepo sin traumas, las mediciones se realizaron diariamente siempre en el mismo horario y antes de aplicar el tratamiento, los animales fueron sometidos a un proceso previo de vasodilatación mediante calentamiento a 32°C durante 30 minutos, y cada medición diaria fue el resultado del promedio de cinco lecturas realizadas a cada animal.

3.2.5 Determinación del posible mecanismo de acción antihipertensivo

3.2.5.1 Evaluación de la actividad diurética

Se utilizaron 20 ratas Holtzmann que se designaron aleatoriamente a 4 grupos (n = 5), según el método de Martínez y col., 2004 (⁵²). Previo ayuno de 18 horas (agua y comida) las ratas fueron hidratadas con 5 ml/100 g de SSF. El grupo 1 recibió 5 ml/kg de SSF (control negativo); el grupo 2 recibió furosemida en dosis de 10 mg/kg VIP (control positivo); los grupos 3 y 4 recibieron extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* en dosis de 200 y 400 mg/kg VIP, respectivamente, según el siguiente diseño.

Grupos: n = 5

Hidratación: SSF 5 mL/100 g.

1. **control:** SSF 5 mL/kg.
2. **Furosemida:** furosemida 10 mg/kg VIP.
3. **EM200:** Extracto metanólico de hojas maracuyá 200 mg/kg VIP.
4. **EM400:** Extracto metanólico de hojas maracuyá 400 mg/kg VIP.

Luego de cada administración las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales y se controló la diuresis a las 2.5 horas, 5.0 horas y 24 horas. El volumen de orina fue expresado en ml/min/100 g de peso corporal.

3.2.5.2 Determinación de los niveles de óxido nítrico

Se utilizaron 36 ratas Holtzmann, las mismas que fueron asignadas aleatoriamente a 6 grupos (n = 6). El primer grupo recibió L-NAME más agua destilada; el segundo, tercer y cuarto grupo recibieron L-NAME más fracción

metanólica del jugo de *Passiflora edulis* en dosis de 100, 200 y 400 mg/kg/día v.o, respectivamente; el quinto grupo recibió L-NAME más captopril en dosis de 100 mg/kg/día v.o; y el sexto grupo sólo recibió agua destilada (grupo control), según el siguiente diseño experimental.

Grupos: n = 6

1. **L-NAME:** L-NAME 50 mg/kg 1v/d x 10 d.
2. **FM100:** L-NAME + fracción metanólica del jugo 100 mg/kg 1v/d x 8 d.
3. **FM200:** L-NAME + fracción metanólica del jugo 200 mg/kg 1v/d x 8 d.
4. **FM400:** L-NAME + fracción metanólica del jugo 400 mg/kg 1v/d x 8 d.
5. **Captopril:** captopril 100 mg/kg 1v/d x 8 d.
6. **Control:** agua destilada

El tratamiento fue por 10 días. Los niveles de óxido nítrico se determinaron de manera indirecta mediante la reacción de Griess que conduce a la formación de cromóforos magenta caracterizado por color grisáceo, cuya intensidad se lee en espectrofotómetro (⁵³).

Se extrajo sangre de las ratas mediante punción cardiaca, se colocó en tubos heparinizados, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se obtuvo el plasma mediante micropipetas. Luego se procedió a desproteínizar el plasma con NaOH 1 M y sulfato de Zinc al 30%. Al plasma desproteínizado se le adicionó Zn metálico, dejándolo reposar durante una hora y 45 minutos, para la reducción de nitratos en nitritos. Transcurrido el tiempo se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm, al sobrenadante se le adicionó reactivo de Griess A y 5 minutos después el Reactivo de Griess B y después de 10 minutos se procedió a la lectura en el espectrofotómetro UV-VIS Labo Med a una longitud de onda de 546 nm.

Los niveles de óxido nítrico se determinaron indirectamente por su conversión a nitritos y nitratos, usando una curva de calibración estándar, y fue expresado en μM .

3.2.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

Se siguió el método de Chang et al., 2001 (⁵⁴) con modificaciones. Se preparó una solución de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ en metanol y del extracto metanólico de *P. edulis* a concentraciones de 200, 100, 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en metanol. Se colocó 0.4 mL de cada concentración

de la muestra y se adicionó 0.8 mL de DPPH, al mismo tiempo se preparó un control con 0.4 mL de etanol y 0.8 mL de DPPH, y un blanco con 0.4 mL de etanol y 0.8 mL de metanol. Se usó el siguiente diseño experimental.

DPPH: 20 µg/mL en metanol

Extracto metanólico de hojas maracuyá: 200, 100, 50 y 10 µg/mL

Problema: 0.4 mL + 0.8 mL DPPH

Control : 0.4 mL etanol + 0.8 mL DPPH

Blanco : 0.4 mL etanol + 0.8 mL metanol

Se mezclaron los tubos y dejó en reposo a temperatura ambiente alejado de la luz durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de estas soluciones en un espectrofotómetro UV-VIS Labo Med a una longitud de onda de 517 nm. Se calculó la Capacidad Antioxidante (CA) según la siguiente ecuación:

$$CA(\%) = 100 \times (A_c - A_s)/A_c$$

Donde A_s es la absorbancia de la muestra y A_c es la absorbancia del control. Se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (CI_{50}), por regresión lineal de la curva concentración-respuesta, donde la abscisa representó la concentración (µg/mL) del extracto y la ordenada el porcentaje de capacidad antioxidante.

3.2.6 Estudio clínico de la seguridad y actividad antihipertensiva coadyuvante

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Código N° 0005/06 de fecha 14 de junio del 2006).

3.2.6.1 Formulación de cápsulas para el tratamiento clínico

Se utilizaron cápsulas, las mismas que se formularon para contener cada una: 500 mg de liofilizado de jugo de maracuyá y como excipientes: 5 mg de Dióxido de silicio (Aerosil®) y 35 mg de Celulosa microcristalina. Las cápsulas de placebo se formularon con 500 mg de almidón. En ambos casos se emplearán cápsulas N° 00 y del mismo color.

3.2.6.2 Muestra

La muestra estuvo constituida por 32 pacientes con diagnóstico definitivo de hipertensión arterial estadio 1, los que fueron incorporados durante 3 meses y distribuidos por orden de llegada a los grupos de estudio establecidos:

3.2.6.3 Diseño experimental del estudio clínico

Grupo I: EP (n=8) : Enalapril 10 mg/día + placebo

Grupo II: EM2 (n=8) : Enalapril 10 mg/día + 2 cápsulas de jugo liofilizado

Grupo III: EM3 (n=8) : Enalapril 10 mg/día +3 cápsulas de jugo liofilizado

Grupo IV: EM4 (n=8) : Enalapril 10 mg/día +4 cápsulas de jugo liofilizado

El estudio se realizó en el servicio de medicina del Hospital Dos de Mayo de Lima, Centro de Salud de Laredo, Centro de Salud de Moche y Hospital Belén de Trujillo, Perú. Los pacientes fueron seleccionados según cumplieron con los criterios de inclusión o exclusión y se designaron aleatoriamente a los 4 grupos de trabajo. Los grupos estuvieron conformados por pacientes con presión sistólica de 140-159 mmHg o presión diastólica de 90-99 mmHg; todos los grupos recibieron enalapril 10 mg/día y además, el primer grupo (n= 8) recibió placebo en cápsulas similares a las del jugo liofilizado de maracuyá (grupo EP); los demás grupos recibieron 2, 3 y 4 cápsulas/día, respectivamente [grupos EM2 (n = 8), EM3 (n= 8) y EM4 (n= 8)]. El tratamiento fue por 4 semanas y la presión arterial se registró cuando el paciente estuvo sentado, luego de 5 minutos de reposo, brazo estirado a nivel del corazón; los registros fueron tomados una vez cada semana.

3.2.6.4 Criterios de inclusión fueron: pacientes con presión sistólica de 140-159 mmHg o presión diastólica de 90-99 mmHg, mayores de 18 años de edad, sin patologías subyacentes.

3.2.6.5 Criterios de exclusión: pacientes con presión sistólica \geq 160 mmHg o presión diastólica \geq 100 mmHg, diabetes mellitus, insuficiencia renal, DCV, fumadores, infarto de miocardio previo.

Al inicio del experimento se realizó un electrocardiograma (EKG) y exámenes de laboratorio: glucosa, creatinina, colesterol total, HDL, triglicéridos y transaminasas. Los exámenes de laboratorio se repitieron al final del estudio.

Se recomendó a los pacientes sujetos de estudio que no ingieran en su dieta diaria sustancias que pudieran causar variables extrañas y variar los resultados (jugo de maracuyá, chicha morada, noni, entre otros).

Todos los sujetos fueron informados acerca del objetivo del estudio, procedimientos y métodos de medición y todos firmaron el consentimiento informado escrito para tomar parte en el estudio. Los datos fueron consignados en las historias clínicas y en formatos preparados para la recolección de datos.

3.2.7 Consideraciones éticas

Para los ensayos preclínicos se tuvieron en cuenta las normas y procedimientos éticos para el manejo de animales de laboratorio establecidos internacionalmente ⁽⁵⁵⁾.

Para los ensayos clínicos se siguió las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial ⁽⁵⁶⁾ y las Buenas Prácticas Clínicas ⁽⁵⁷⁾.

3.2.8 Análisis de los resultados

Los datos fueron expresados como media aritmética \pm error estándar, porcentajes, figuras, etc. Para el análisis estadístico de las variables cuantitativas se empleó el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) que permitió determinar si existe diferencia estadísticamente significativa para la variable evaluada intergrupos e intragrupos, luego se realizó un análisis post hoc mediante el test de Scheffé. El nivel de significancia fijado fue $P < 0.05$. Se usó el software estadístico SPSS for Windows 15.0 año 2006.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio fitoquímico preliminar

4.1.1 Identificación taxonómica

La muestra vegetal fue identificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y de acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981, se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Caryophyllidae
ORDEN : Violales
FAMILIA : PASSIFLORACEAE
GENERO : *Passiflora*
ESPECIE : *Passiflora edulis* Sims

4.1.2 Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios

El screening fitoquímico demostró que existen diferencias en la composición química del jugo del fruto y el extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis*, tal como se muestra en la Tabla 1. Se determinó mayor cantidad de flavonoides y alcaloides en el jugo del fruto, así como la presencia de saponinas de tipo esférico y quinonas; mientras que en el extracto etanólico de las hojas se encontró mayor cantidad de cumarinas, así como saponinas de tipo triterpenoide y taninos de tipo catélico.

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto etanólico de las hojas y el jugo del fruto de *Passiflora edulis*

| Metabolito secundario | Extracto etanólico de las hojas | Jugo del fruto |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Saponinas | ++ (tipo triterpenoide) | ++ (tipo esteroideal) |
| Taninos | ++ (tipo catéquico) | - |
| Flavonoides | + | +++ |
| Cumarinas | +++ | ++ |
| Quinonas | - | +++ |
| Alcaloides | + | ++ |

-, ausente; +, poca cantidad; ++, mediana cantidad; +++, mayor cantidad

4.2 Evaluación de la seguridad en animales

4.2.1 Toxicidad aguda oral: determinación de la DL50

En la evaluación de la toxicidad aguda oral, los signos que con mayor frecuencia se observaron, en relación directa con la dosis, fueron sedación y letargia, que en algunos casos desapareció en las primeras 24 horas después de la administración y en otros casos produjo la muerte del animal. La mortalidad obtenida por cada dosis de ensayo, tanto para el extracto de las hojas como para el jugo de *Passiflora edulis* se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad obtenido con el extracto etanólico de las hojas y el jugo de *Passiflora edulis*

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | N | Nº muertos | Mortalidad (%) |
|-------------|---------------|----|------------|----------------|
| Hojas | 2500 | 10 | 0 | 0 |
| | 5000 | 10 | 1 | 10 |
| | 7500 | 10 | 2 | 20 |
| | 10000 | 10 | 3 | 30 |
| | 12500 | 10 | 7 | 70 |
| | 15000 | 10 | 9 | 90 |
| | 17500 | 10 | 10 | 100 |
| Jugo | 2500 | 10 | 0 | 0 |
| | 5000 | 10 | 0 | 0 |
| | 10000 | 10 | 1 | 10 |
| | 15000 | 10 | 2 | 20 |
| | 20000 | 10 | 4 | 40 |

La dosis letal 50 (DL50) estimada para el extracto etanólico de las hojas fue 10687 mg/kg con límites de confianza del 95% de 9243 a 12203 mg/kg, mientras que para el jugo del fruto fue 21471 mg/kg con límites de confianza del 95% de 17368 a 42769, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Estimación de la dosis letal 50 (DL50) del extracto etanólico de las hojas y el jugo de *P.edulis*

| Tratamiento | DL50 mg/kg | Límites de confianza 95% | |
|--------------------|-------------------|---------------------------------|-------|
| Hojas | 10687 | 9243 | 12203 |
| Jugo | 21471 | 17368 | 42769 |

En la necropsia no se encontraron evidencias macroscópicas de alteraciones de los órganos tales como hígado, bazo, riñones, corazón y pulmones. Tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos cuando se analizó el peso relativo de los órganos.

4.2.2 Toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días

Durante el periodo de tratamiento de 28 días, no se observaron síntomas tóxicos a la dosis administrada, tanto a nivel físico general como del comportamiento; tampoco se presentó mortalidad de los animales, observándose 100% de supervivencia al final del estudio; ni disminución del peso corporal, y la tendencia al aumento fue una constante durante el estudio en ambos sexos, tal como se muestra en la tabla 4. Los datos se analizaron de manera independiente para cada sexo y el análisis estadístico no mostró diferencias significativas del grupo tratado respecto al control en ambos sexos. Las figuras 1 y 2 muestran gráficamente el comportamiento del peso corporal en hembras y machos.

Tabla 4. Variaciones en el peso corporal durante el ensayo con el extracto metanólico de *P. edulis*

| sexo | Semana | Peso corporal (g) | |
|----------------|--------|-------------------|---------------|
| | | Grupo control | Grupo tratado |
| Machos | 0 | 365.0 ± 10.2 | 344.4 ± 10.6 |
| | 1 | 379.8 ± 10.5 | 347.0 ± 10.5 |
| | 2 | 383.4 ± 9.7 | 346.8 ± 8.5 |
| | 3 | 391.6 ± 10.6 | 352.0 ± 10.0 |
| | 4 | 402.8 ± 11.9 | 366.2 ± 9.3 |
| Hembras | 0 | 251.0 ± 7.9 | 245.0 ± 9.3 |
| | 1 | 267.2 ± 6.9 | 260.2 ± 10.2 |
| | 2 | 273.0 ± 6.6 | 263 ± 10.9 |
| | 3 | 276.6 ± 6.2 | 265.0 ± 12.2 |
| | 4 | 277.8 ± 6.3 | 265.6 ± 9.5 |

Valores expresados como media aritmética ± Error estándar

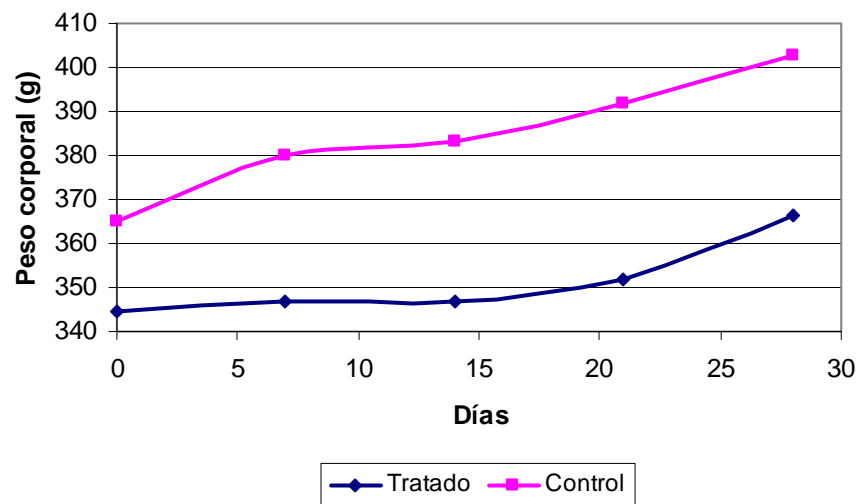


Fig. 1. Comportamiento del peso corporal durante el estudio en machos

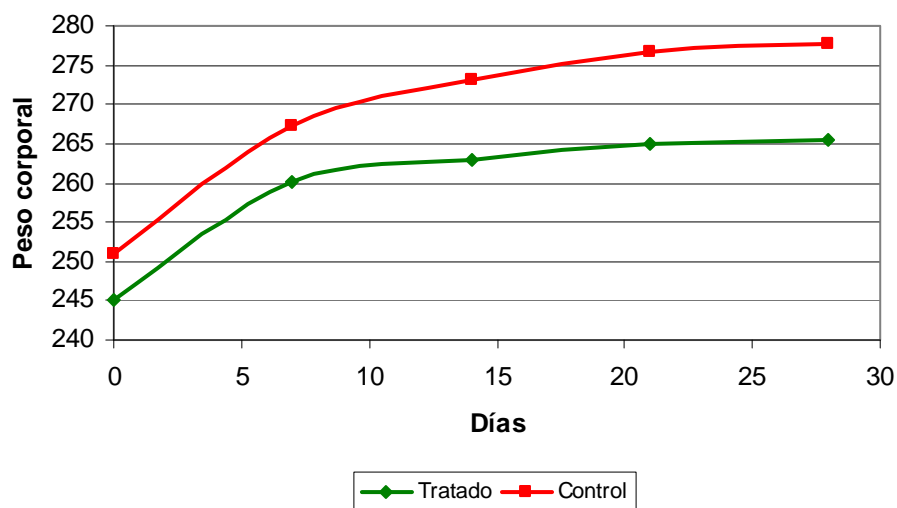


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal durante el estudio en hembras

Los valores medios de los indicadores hematológicos se reportan en la tabla 5. No se observaron alteraciones en la fórmula leucocitaria observándose en todo momento células maduras acorde con su desarrollo, correspondiente con un comportamiento normal.

Tabla 5. Variaciones en los parámetros hematológicos después de 28 días de tratamiento diario con 200 mg/kg de extracto metanólico de *P. edulis*

| Grupo | Leucocitos (x10 ³ /uL) | Neutrófilos (%) | Linfocitos (%) | Monocitos (%) | Eosinófilos (%) | Basófilos (%) |
|----------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Machos | | | | | | |
| V.N.* | 3.4-5.6 | 22.8-28.3 | 70.5-75.8 | 0-4 | 0-4 | 0-1 |
| Control | 4.2 ± 0.5 | 25.6 ± 0.9 | 72.8 ± 1.1 | 1.2 ± 0.2 | 0.8 ± 0.4 | 0.4 ± 0.2 |
| Tratado | 4.1 ± 0.5 | 26.0 ± 0.9 | 73.0 ± 0.9 | 1.4 ± 0.5 | 1.2 ± 0.6 | 0.2 ± 0.1 |
| Hembras | | | | | | |
| V.N.* | 2.8-5.4 | 21.1-27.3 | 70.8-77.8 | 0-4 | 0-4 | 0-1 |
| Control | 4.4 ± 0.5 | 24.6 ± 0.9 | 74.0 ± 1.2 | 1.4 ± 0.5 | 0.8 ± 0.4 | 0.2 ± 0.2 |
| Tratado | 4.2 ± 0.5 | 23.2 ± 1.2 | 74.6 ± 0.7 | 1.8 ± 0.6 | 1.0 ± 0.5 | 0.6 ± 0.2 |

Valores expresados como media aritmética ± Error estándar

V.N. = valores normales

*Fuente: González Y, Scull I, et al. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med*, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796. ⁽⁶⁰⁾

La tabla 6 refleja el comportamiento de los indicadores medios de química sanguínea. Para ambos sexos, los indicadores evaluados se encuentran dentro de los límites normales establecidos para la especie, excepto alanina

aminotransferasa (ALT) que se incrementó ligeramente por encima de los valores normales (VN), alcanzando el valor de 55.4 ± 4.9 U/L en machos (VN = 35.1-53.5) y 53.8 ± 3.9 U/L (VN = 28.8-46.0) en hembras.

Tabla 6. Variaciones en los parámetros de química sanguínea después de 28 días de tratamiento diario con 200 mg/kg de extracto metanólico de *P. edulis*

| Grupo | Glucosa (mg/dL) | Colesterol T (mg/dL) | Triglicéridos (mg/dL) | Alanina amino-transferasa (U/L) |
|----------------|--------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Machos | | | | |
| V.N.* | 95.7-147.7 | 36.6-57.2 | 33.3-65.5 | 35.1-53.5 |
| Control | 120.4 ± 10.3 | 50.6 ± 3.1 | 56.6 ± 6.4 | 46.8 ± 4.1 |
| Tratado | 118.4 ± 10.1 | 49.0 ± 2.7 | 55.2 ± 6.3 | 55.4 ± 4.9 |
| Hembras | | | | |
| V.N.* | 112.9-170.9 | 44.4-68.2 | 38.1-66.1 | 28.8-46.0 |
| Control | 128.8 ± 7.6 | 58.8 ± 5.2 | 58.2 ± 4.4 | 40.6 ± 3.3 |
| Tratado | 126.6 ± 6.2 | 57.4 ± 5.0 | 57.8 ± 5.9 | 53.8 ± 3.9 |

Valores expresados como media aritmética \pm Error estándar

V.N. = valores normales

*Fuente: González Y, Scull I, et al. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med*, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796. ⁽⁶⁰⁾

No se produjo la muerte de ningún animal durante el estudio, por ello todos fueron sacrificados al finalizar la investigación. Al realizar la necropsia no se encontraron lesiones macroscópicas atribuibles a la sustancia de ensayo.

Los valores de los pesos relativos de los órganos, en relación con el peso corporal (%), no mostraron diferencias significativas respecto al control, tanto para machos como para hembras. Tabla 7

Tabla 7. Variaciones del peso relativo de órganos después de 28 días de tratamiento diario con 200 mg/kg de extracto metanólico de *P. edulis*

| Grupos | Corazón | Hígado | Bazo | Riñones | Pulmón | Ovarios | Testículos |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Machos | | | | | | | |
| Control | 0.47 ± 0.02 | 3.58 ± 0.07 | 0.36 ± 0.04 | 0.78 ± 0.01 | 0.91 ± 0.05 | | 0.41 ± 0.06 |
| Tratado | 0.44 ± 0.02 | 3.67 ± 0.10 | 0.37 ± 0.04 | 0.77 ± 0.03 | 0.91 ± 0.07 | | 0.43 ± 0.04 |
| Hembras | | | | | | | |
| Control | 0.38 ± 0.01 | 3.02 ± 0.04 | 0.24 ± 0.01 | 0.63 ± 0.01 | 0.85 ± 0.09 | 1.03 ± 0.05 | |
| Tratado | 0.39 ± 0.01 | 3.16 ± 0.06 | 0.28 ± 0.02 | 0.65 ± 0.02 | 0.99 ± 0.13 | 1.10 ± 0.04 | |

Valores expresados como media aritmética \pm Error estándar

Diferencias no significativas respecto al control, tanto para machos como para hembras, analizados por ANOVA de un factor y una prueba post hoc de Scheffe.

Peso relativo = $100 \times \text{peso del \acute{o}rgano} / \text{peso corporal}$

En el estudio histopatol3gico de los 3rganos se observ3 en el h3gado en un caso microves3culas focal de hepatocitos y en otro caso infiltrado inflamatorio cr3nico mononuclear periportal focal y congesti3n vascular, como se muestra en la Fig. 3B. En ri3n3n se observ3 en 2 casos focos de necrosis tubular, mostrado en la Fig. 4B.

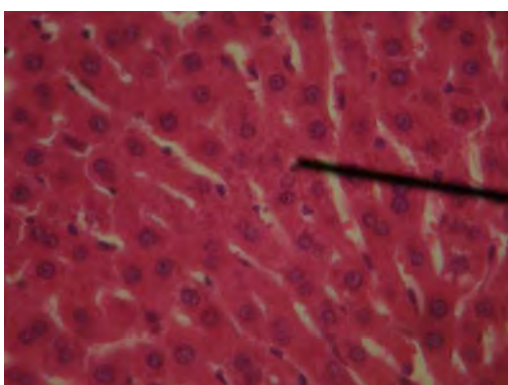


Fig. 3A H3gado normal (grupo control)
Coloraci3n HE. 10x

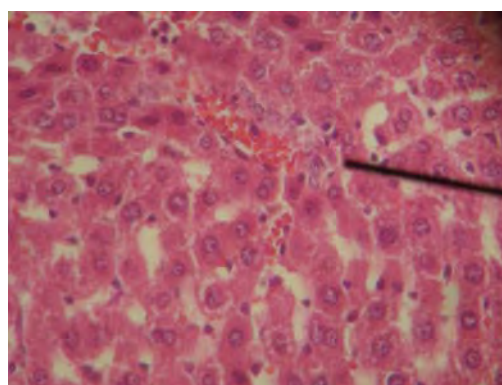


Fig. 3B Infiltrado inflamatorio cr3nico mononuclear periportal focal y congesti3n vascular. HE. 10X

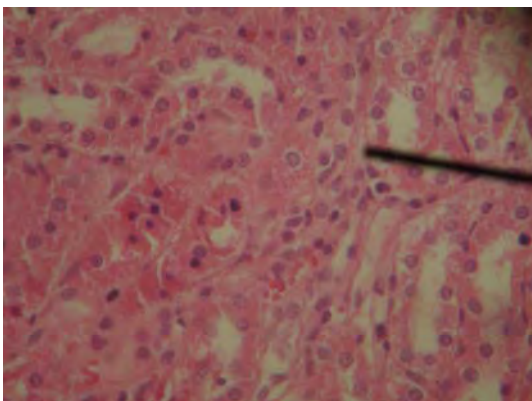


Fig. 4A Ri3n3n normal (grupo control)
Coloraci3n HE. 10x

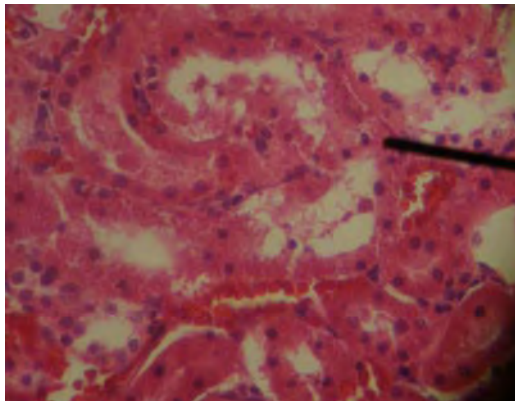


Fig. 4B Nefritis cr3nica focal con necrosis tubular focal. (grupo tratado) Coloraci3n HE. Observ. 40x

4.3 Determinaci3n de la actividad antihipertensiva en ratas

La presi3n arterial se increment3 r3pidamente en dos d3as por efecto del tratamiento con L-NAME, desde $129,7 \pm 1,4$ mmHg (D0) hasta $162,7 \pm 1,8$

mmHg (D2) en el grupo L-NAME, un efecto similar se observó en los demás grupos, por lo que marcó el inicio del tratamiento con las muestras. Se observó una disminución de la presión arterial por efecto del tratamiento con el extracto etanólico de las hojas, del jugo del fruto, y la fracción metanólica del jugo de *P. edulis*, tal como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Variación de la Presión arterial (mmHg) en ratas hipertensas por L-NAME tratadas con *Passiflora edulis**

| GRUPO | DIA | PAS | PAD | PAM | % de eficacia antihipertensiva (PAS) |
|---------------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| L-NAME | D0 | 129,7 ± 1,4 | 80,0 ± 1,5 | 96,2 ± 1,0 | |
| | D2 | 162,7 ± 1,8 | 115,5 ± 5,1 | 131,0 ± 3,6 | |
| | D3 | 167,7 ± 1,7 | 116,3 ± 2,9 | 133,0 ± 1,9 | |
| | D4 | 169,2 ± 2,0 | 123,0 ± 2,8 | 137,8 ± 2,3 | |
| | D7 | 174,7 ± 3,4 | 121,5 ± 5,4 | 138,8 ± 4,5 | |
| | D10 | 179,7 ± 1,6 | 136,2 ± 3,2 | 150,3 ± 2,3 | |
| Hojas | D0 | 125,7 ± 2,0 | 78,3 ± 3,9 | 93,8 ± 2,7 | |
| | D2 | 165,5 ± 1,9 | 109,5 ± 3,6 | 127,8 ± 2,9 | |
| | D3 | 157,2 ± 2,3 ^a | 105,5 ± 2,1 | 122,3 ± 1,9 ^b | 6.3 |
| | D4 | 154,2 ± 2,0 ^c | 108,0 ± 4,9 ^b | 122,8 ± 3,6 ^d | 8.9 |
| | D7 | 145,8 ± 3,7 ^c | 93,2 ± 3,7 ^c | 110,2 ± 3,6 ^c | 16.5 |
| | D10 | 154,3 ± 2,4 ^c | 110,7 ± 4,2 ^c | 125,0 ± 3,6 ^c | 14.1 |
| Jugo | D0 | 121,5 ± 2,9 | 74,3 ± 3,0 | 89,7 ± 2,8 | |
| | D2 | 163,0 ± 1,8 | 114,0 ± 6,0 | 130,2 ± 4,4 | |
| | D3 | 156,2 ± 2,1 ^d | 104,0 ± 3,8 ^b | 120,8 ± 2,6 ^b | 6.9 |
| | D4 | 149,8 ± 2,9 ^c | 107,0 ± 3,0 ^b | 120,8 ± 2,8 ^d | 11.5 |
| | D7 | 145,3 ± 3,1 ^c | 96,5 ± 4,5 ^c | 112,3 ± 3,8 ^c | 16.8 |
| | D10 | 149,2 ± 2,1 ^c | 109,8 ± 3,2 ^c | 122,5 ± 2,5 ^c | 17.0 |
| Fracción metanólica | D0 | 128,5 ± 1,5 | 77,5 ± 3,0 | 93,8 ± 2,3 | |
| | D2 | 162,8 ± 3,5 | 116,3 ± 4,6 | 131,5 ± 3,5 | |
| | D3 | 165,8 ± 3,5 | 108,3 ± 6,2 | 127,3 ± 4,9 | 1.1 |
| | D4 | 161,3 ± 2,0 ^b | 113,0 ± 5,4 | 128,8 ± 3,9 | 4.7 |
| | D7 | 147,8 ± 5,5 ^c | 108,0 ± 2,9 ^b | 120,8 ± 3,6 ^d | 15.4 |
| | D10 | 149,5 ± 1,5 ^c | 116,8 ± 1,7 ^c | 127,3 ± 1,6 ^c | 16.8 |
| Captopril | D0 | 125,3 ± 1,5 | 78,3 ± 3,0 | 93,7 ± 0,9 | |
| | D2 | 166,2 ± 2,3 | 129,5 ± 4,9 | 141,5 ± 3,7 | |
| | D3 | 139,8 ± 2,4 | 97,0 ± 4,6 | 110,7 ± 3,5 | 16.6 |
| | D4 | 135,5 ± 1,9 | 94,7 ± 5,4 | 108,0 ± 3,8 | 19.9 |
| | D7 | 137,3 ± 1,3 | 90,0 ± 4,0 | 105,5 ± 2,7 | 21.4 |
| | D10 | 132,2 ± 2,3 | 80,7 ± 3,1 | 97,5 ± 2,2 | 26.4 |

*Datos son expresados como Media aritmética ± error estándar, analizados por ANOVA de un factor y una prueba post hoc de LSD. PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; PAM, presión arterial media.

^a p < 0.01 vs grupo L-NAME, ^b p < 0.05 vs grupo L-NAME,
^c p < 0.001 vs grupo L-NAME, ^d p < 0.005 vs grupo L-NAME

El extracto etanólico de las hojas, disminuyó significativamente la presión arterial sistólica (PAS) desde el primer día de tratamiento (D3), observándose una reducción hasta $157,2 \pm 2,3$ mmHg comparado con $167,7 \pm 1,7$ mmHg del grupo L-NAME ($p < 0.01$); el efecto reductor de la PAS prosiguió hasta $145 \pm 3,7$ mmHg (D7) y al final del experimento (D10) fue $154,3 \pm 2,4$ mmHg vs $179,7 \pm 1,6$ mmHg del grupo L-NAME ($p < 0.001$). La presión arterial diastólica (PAD), también disminuyó significativamente por este tratamiento, a partir del segundo día (D4) donde se registró $108,0 \pm 4,9$ mmHg vs $123,0 \pm 2,8$ mmHg del grupo L-NAME ($p < 0.05$).

El jugo del fruto de *Passiflora edulis*, desde el primer día de tratamiento (D3) disminuyó significativamente la PAS hasta $156,2 \pm 2,1$ mmHg vs $167,7 \pm 1,7$ mmHg del grupo L-NAME ($p < 0.05$) y la PAD hasta $104,0 \pm 3,8$ mmHg vs $116,3 \pm 2,9$ mmHg del control L-NAME ($p < 0.05$); tanto la PAS como la PAD continuaron disminuyendo en el día 7 (D7) hasta $145,3 \pm 3,1/96,5 \pm 4,5$ mmHg y al final del experimento (D10) fue $149,2 \pm 2,1/109,8 \pm 3,2$ mmHg comparado con $179,7 \pm 1,6/136,2 \pm 3,2$ mmHg del control L-NAME ($p < 0.001$).

La fracción metanólica del jugo de *P. edulis* disminuyó la PAS a partir del segundo día de tratamiento (D4) hasta $161,3 \pm 2,0$ mmHg comparado con $169,2 \pm 2,0$ mmHg del grupo L-NAME ($p < 0.05$), en el día D7 disminuyó tanto la PAS como la PAD hasta $147,8 \pm 5,5/108,0 \pm 2,9$ mmHg; y en el día D10, hasta $149,5 \pm 1,5/116,8 \pm 1,7$ mmHg vs $179,7 \pm 1,6/136,2 \pm 3,2$ mmHg del control L-NAME ($p < 0.001$). Las variaciones de presión arterial sistólica se muestran gráficamente en la Fig. 5.

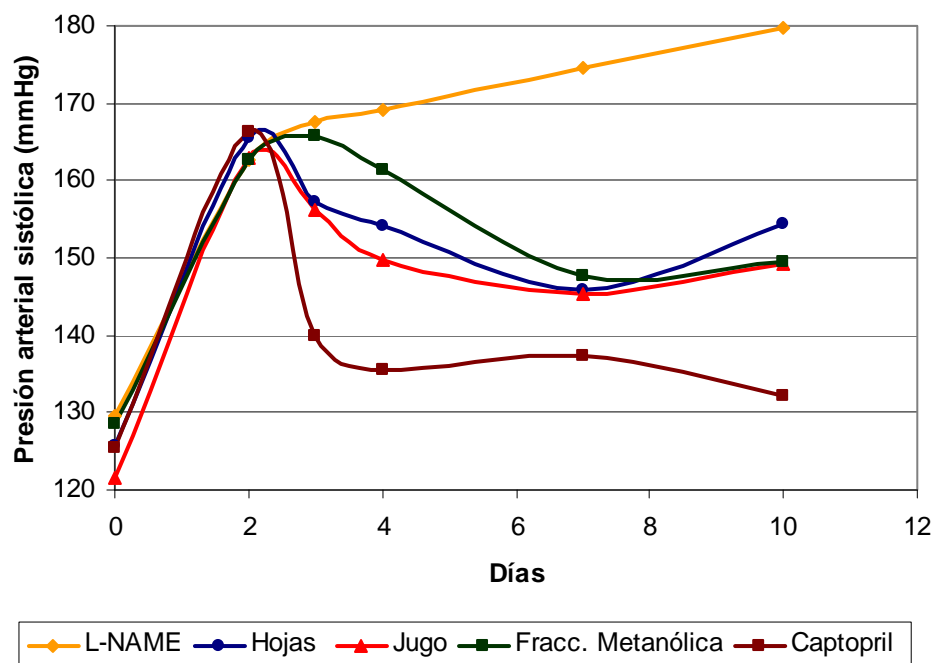


Fig. 5. Efecto del tratamiento con *Passiflora edulis* sobre la presión arterial sistólica en ratas hipertensas por L-NAME

4.4 Determinación del posible mecanismo de acción antihipertensiva

4.4.1 Evaluación de la actividad diurética

Al comparar los valores medios de los volúmenes de orina/100 g de peso corporal por grupo, obtenidos después de la administración de las sustancias evaluadas, a las 2.5 horas se observó volúmenes semejantes para la SSF (0.74 ± 0.15 ml/100 g) y las muestras de *P. edulis* (0.761 ± 0.20 y 0.768 ± 0.23 mL/100 g para la EM200 y EM400, respectivamente); sin embargo, la furosemida mostró un volumen de 6.698 ± 0.52 ml/100 g, el cual fue significativamente mayor que el de SSF ($p < 0.0001$); el volumen acumulado a las 5.0 horas se incrementó en todos los grupos, pero con furosemida el incremento fue muy leve; a las 24 horas, el volumen acumulado para EM200 fue 7.933 ± 0.27 mL/100 g y para EM400 fue 8.268 ± 0.41 mL/100 g, los cuales fueron significativamente diferentes del grupo SSF (6.386 ± 0.19) con una $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, pero no fueron significativamente diferentes

del grupo furosemida (8.533 ± 0.17 mL/100 g). Estos resultados se muestran gráficamente en la Fig. 6.

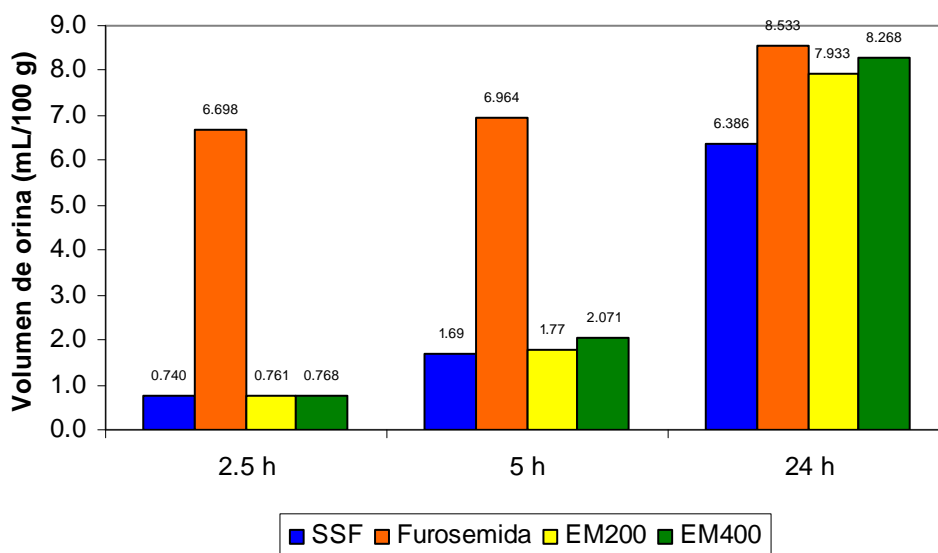


Fig. 6. Variación del volumen de orina excretada (mL/100 g de p.c.) acumulada según el tiempo durante 24 horas, por efecto del tratamiento con *P. edulis*

La Fig. 7. muestra el comportamiento diurético de las sustancias evaluadas en cada periodo de tiempo que se realizaron las mediciones del volumen. El Volumen Minuto de Orina (VMO) fue máximo para furosemida en las primeras 2.5 h en que alcanzó el valor de 0.0447 ± 0.035 mL/min/100 g, mientras que SSF, EM200 y EM400 alcanzaron volúmenes de 0.0049 ± 0.001 , 0.0051 ± 0.0013 y 0.0051 ± 0.0051 mL/min/100 g, respectivamente. En las siguientes 2.5 h (medición a las 5 h), el VMO se incrementó para SSF, EM200 y EM400, mientras que para furosemida disminuyó dramáticamente; en las últimas 19 h (medición a las 24 h), el VMO disminuyó en todos los grupos, pero más pronunciado en el caso de furosemida.

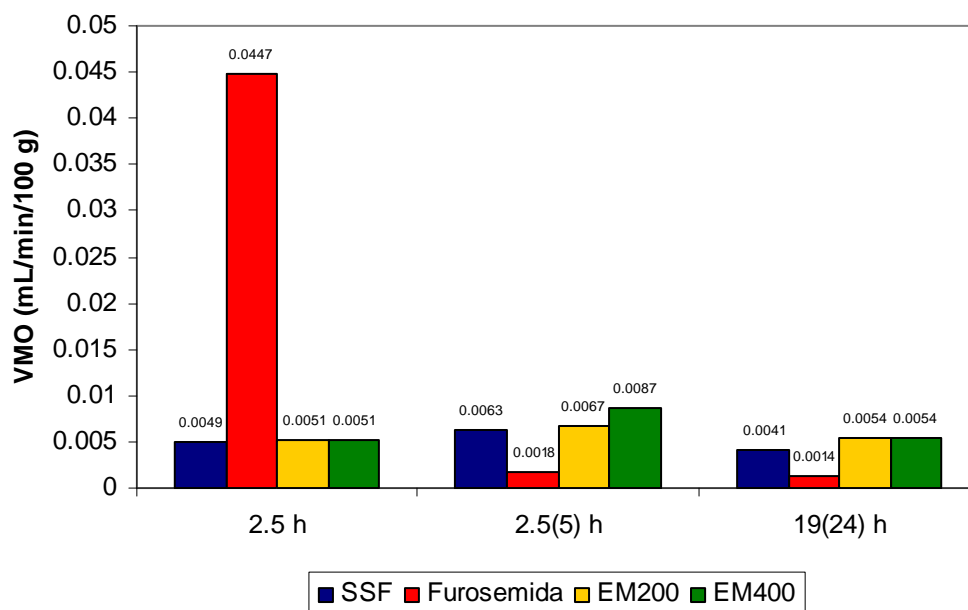


Fig. 7. Variación del Volumen Minuto de Orina (VMO) (mL/min/100 g) en cada periodo de medición

El VMO acumulado en 24 h se muestra en la Fig. 8. Los grupos EM200 y EM400 alcanzaron 0.0055 ± 0.0002 y 0.0058 ± 0.0003 mL/min/100 g, respectivamente, lo cual es significativamente diferente de 0.0044 ± 0.0001 mL/min/100 g del grupo SSF ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente). Estos valores no difieren significativamente de 0.0059 mL/min/100 g del grupo furosemida. Esto nos indicaría que *P. edulis* en las dosis ensayadas tiene eficacia diurética similar a furosemida, pero de efecto más lento en comparación con el rápido efecto de furosemida.

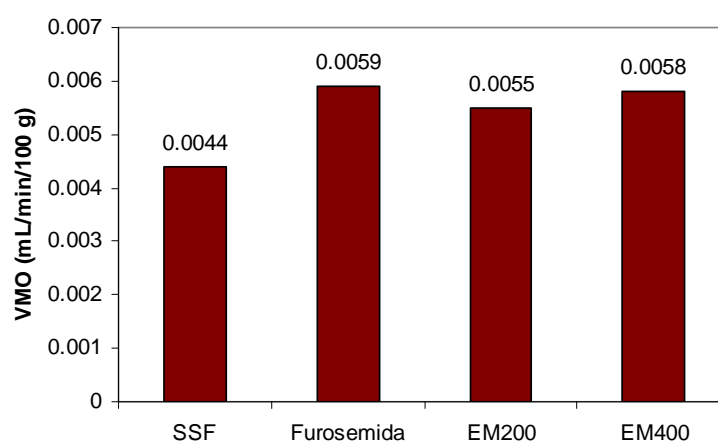


Fig. 8. VMO (mL/min/100 g) después de 24 horas de tratamiento con *P. edulis*

4.4.2 Determinación de los niveles de óxido nítrico

Los niveles de óxido nítrico medidos al final del experimento se muestran en la Fig. 9. Se observó una reducción significativa de $1,84 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (grupo control) hasta $0,57 \pm 0,04 \mu\text{M}$ por efecto del tratamiento con L-NAME ($p < 0,001$). Asimismo, se observó un incremento de óxido nítrico, dependiente de la dosis, en los grupos tratados con la fracción metanólica (FM) del jugo de *P. edulis*, comparado con el grupo L-NAME, el cual no fue significativo ($p = 0,924$) con la dosis de 100 mg/kg (FM100) que alcanzó $0,65 \pm 0,05 \mu\text{M}$; sin embargo, con FM200 y FM400 alcanzaron niveles de $0,87 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) y $0,90 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$), respectivamente. Estos 2 grupos no mostraron diferencia significativa con el grupo captopril ($p = 0,774$ y $0,936$, respectivamente). Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

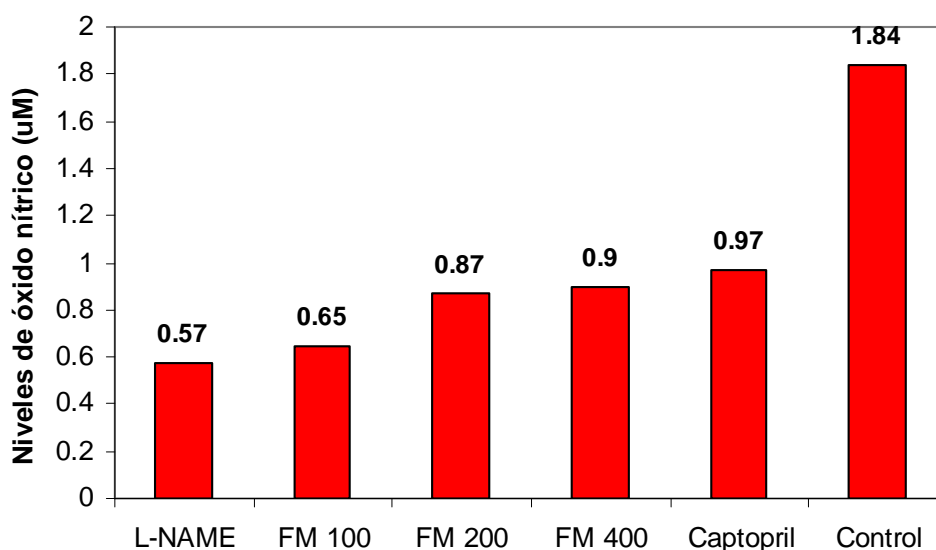


Fig. 9. Niveles de óxido nítrico en ratas hipertensas por L-NAME al finalizar el tratamiento con la fracción metanólica (FM) del jugo de *P. edulis*

4.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

La actividad secuestradora del radical libre DPPH (capacidad antioxidante) del extracto metanólico de las hojas de *P. edulis* se muestra en la tabla 9. Se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis.

Tabla 9. Actividad secuestradora de DPPH por el extracto metanólico de *P. edulis*

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Capacidad antioxidante (%) |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| 200 | 75.85 |
| 100 | 44.89 |
| 50 | 24.15 |
| 10 | 4.33 |

La curva concentración-respuesta fue ajustada mediante un análisis de regresión lineal utilizando el software MS Excel, tal como se muestra en la Fig. 10. Esto nos permitió calcular gráficamente la CI_{50} , la cual fue $124 \mu\text{g/mL}$.

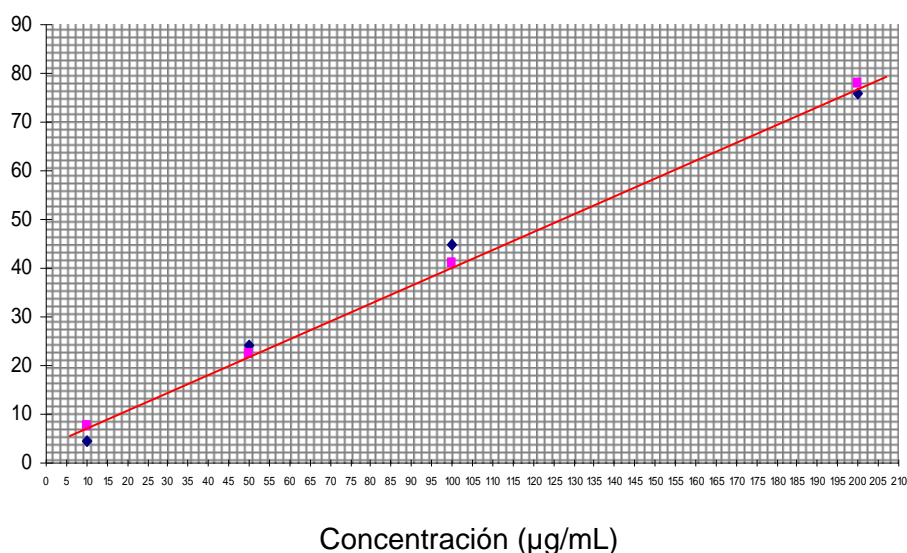


Fig. 10. Curva dosis-respuesta ajustada del porcentaje de inhibición de DPPH vs concentración del extracto metanólico de *P. edulis* ($\mu\text{g/mL}$) y determinación de la CI_{50}

4.5 Estudio clínico de la actividad antihipertensiva coadyuvante

Las características generales de los pacientes que participaron en el estudio se presentan en la tabla 10. La edad media de los cuatro grupos de estudio fue 61 años con un mínimo de 43 y un máximo de 83 años, y un intervalo de confianza para la media al 95% de 57.15 a 65.09 años.

Tabla 10. Características generales de los pacientes con hipertensión estadio 1 que participaron en el estudio clínico de Enalapril-maracuyá durante 28 días

| Características | Grupo | | | |
|---------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| | EP (n=8) | EM2 (n=8) | EM3 (n=8) | EM4 (n=8) |
| Edad | | | | |
| Media \pm DE | 59.3 \pm 13.7 | 60.0 \pm 9.9 | 61.6 \pm 9.8 | 63.6 \pm 12 |
| Rango | 43 - 80 | 44 - 77 | 46 - 77 | 50 - 83 |
| Sexo: N° (%) | | | | |
| Masculino | 5 (62.5) | 3 (37.5) | 2 (25.0) | 4 (50.0) |
| Femenino | 3 (37.5) | 5 (62.5) | 6 (75.0) | 4 (50.0) |

EP, Enalapril + placebo

EM2, Enalapril + 2 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM3, Enalapril + 3 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM4, Enalapril + 4 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

Los valores de presión arterial tanto sistólica (PAS) como diastólica (PAD) y media (PAM) no difirieron estadísticamente entre los grupos en la medición basal. La presión sanguínea fue disminuyendo paulatinamente, en todos los grupos, desde la primera semana y se mantuvo esta tendencia hasta el final del experimento como se muestra en la Tabla 11. No obstante, los grupos que recibieron enalapril más maracuyá produjeron una mejor reducción de la presión sanguínea en comparación con el grupo que recibió enalapril más placebo. Esta reducción no fue estadísticamente significativa para el caso de PAS, a pesar que el grupo que recibió tratamiento con 4 cápsulas de maracuyá/día (grupo EM4) produjo una reducción de PAS de hasta 6.81 mmHg en la segunda semana, culminando con una reducción de 6,73 mmHg en la cuarta semana, respecto del placebo (grupo EP). Sin embargo, en el grupo EM4 se produjo una reducción significativa de PAD y PAM desde la segunda semana de tratamiento hasta el fin del experimento, observándose una

disminución de PAD de 5,33 mmHg en la cuarta semana ($p < 0.05$); mientras que la reducción de la PAM fue de 6,10 mmHg ($p < 0.05$), 6,12 mmHg ($p < 0.005$) y 5,80 mmHg ($p < 0.05$) en la segunda, tercera y cuarta semana de tratamiento, respectivamente, en comparación con el grupo EP.

Tabla 11 Variación de la Presión arterial (mmHg) en pacientes con hipertensión estadio 1 tratados con enalapril más *pasiflora edulis*

| Grupo | Medición | PAS (mmHg) | PAD (mmHg) | PAM (mmHg) |
|-------|----------|-------------------|--------------------|--------------------|
| EP | Basal | 146,25 \pm 2,06 | 90,00 \pm 1,64 | 108,75 \pm 1,63 |
| | Semana 1 | 139,37 \pm 1,99 | 85,00 \pm 1,89 | 103,12 \pm 1,62 |
| | Semana 2 | 136,25 \pm 2,63 | 80,75 \pm 1,41 | 99,25 \pm 1,76 |
| | Semana 3 | 131,87 \pm 2,66 | 78,25 \pm 1,28 | 96,12 \pm 1,56 |
| | Semana 4 | 130,62 \pm 3,05 | 77,00 \pm 1,56 | 94,87 \pm 1,89 |
| EM2 | Basal | 147,50 \pm 2,99 | 90,50 \pm 2,65 | 109,50 \pm 2,53 |
| | Semana 1 | 136,25 \pm 1,83 | 83,12 \pm 2,98 | 100,83 \pm 2,42 |
| | Semana 2 | 132,50 \pm 1,64 | 79,37 \pm 1,99 | 97,08 \pm 1,47 |
| | Semana 3 | 128,75 \pm 2,05 | 78,75 \pm 1,25 | 95,42 \pm 0,52 |
| | Semana 4 | 126,87 \pm 1,87 | 75,62 \pm 1,75 | 92,71 \pm 1,44 |
| EM3 | Basal | 148,33 \pm 2,36 | 91,11 \pm 0,73 | 110,18 \pm 1,13 |
| | Semana 1 | 136,11 \pm 2,00 | 82,78 \pm 2,22 | 100,56 \pm 1,88 |
| | Semana 2 | 132,22 \pm 3,24 | 77,22 \pm 1,47 | 95,56 \pm 1,67 |
| | Semana 3 | 128,33 \pm 2,89 | 77,22 \pm 1,47 | 94,26 \pm 1,39 |
| | Semana 4 | 124,44 \pm 2,82 | 72,78 \pm 1,21 | 90,00 \pm 1,08 |
| EM4 | Basal | 147,22 \pm 2,22 | 90,44 \pm 1,68 | 109,37 \pm 1,58 |
| | Semana 1 | 134,67 \pm 3,06 | 80,33 \pm 1,09 | 98,44 \pm 1,63 |
| | Semana 2 | 129,44 \pm 2,94 | 75,00 \pm 1,18* | 93,15 \pm 1,37* |
| | Semana 3 | 126,89 \pm 2,23 | 71,56 \pm 1,20** | 90,00 \pm 0,96** |
| | Semana 4 | 123,89 \pm 2,32 | 71,67 \pm 1,18* | 89,07 \pm 1,39* |

Valores expresados como media \pm error estándar

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; PAM, presión arterial media (mmHg)

EP, Enalapril + placebo

EM2, Enalapril + 2 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM3, Enalapril + 3 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM4, Enalapril + 4 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

* $p < 0,05$ vs grupo EP

** $p < 0.005$ vs grupo EP

La variación de la presión arterial media a lo largo de las 4 semanas de tratamiento se muestra gráficamente en la Fig. 11. Se observó una mejor reducción de la presión arterial por efecto del tratamiento coadyuvante con *P. edulis*.

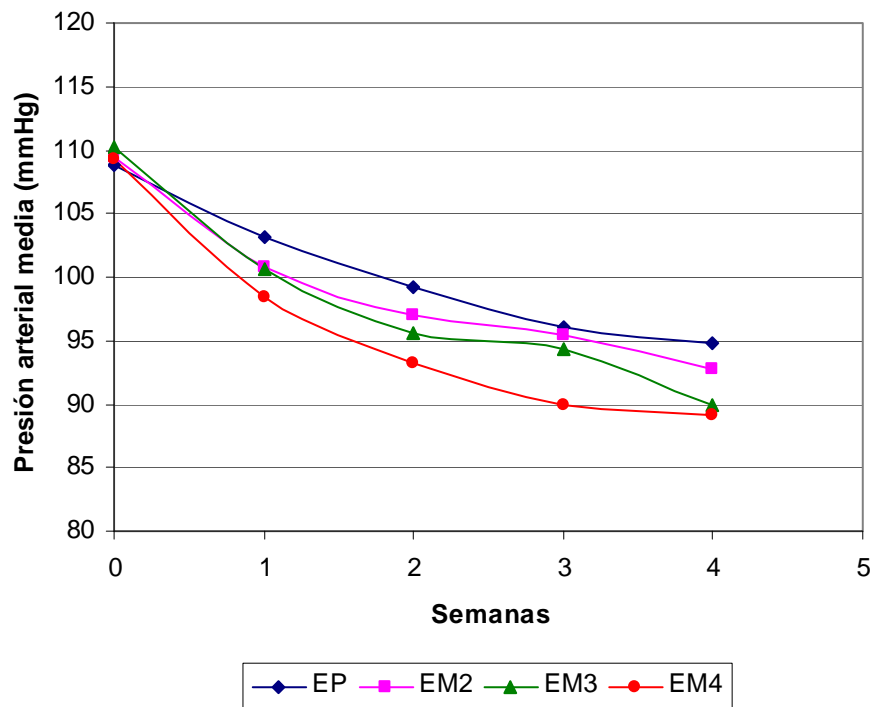


Fig. 11. Efecto de *P.edulis* (maracuyá) sobre la presión arterial media en pacientes hipertensos estadio 1 tratados con enalapril

Los resultados de los parámetros bioquímicos en sangre realizados al finalizar el experimento, no mostraron alteración en comparación con los realizados al inicio del mismo, manteniéndose dentro de los valores considerados normales, tal como se presenta en la tabla 12. La observación clínica de los pacientes tratados puso en evidencia que en un solo caso se presentó un cuadro de diarrea leve que no motivó la suspensión del tratamiento.

Tabla 12. Parámetros bioquímicos al inicio y al final del estudio en pacientes hipertensos estadio 1 tratados con Enalapril + maracuyá durante 28 días.

| Grupo | Glucosa (mg/dL) | | Colesterol total (mg/dL) | | HDL (mg/dL) | | Triglicéridos (mg/dL) | | Creatinina (mg/dL) | | TGO (U/L) | | TGP (U/L) | |
|------------------|--------------------|---------------|-----------------------------|----------------|----------------|---------------|--------------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|
| | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final |
| EP | 90.5 ± 5.0 | 90.1 ± 3.8 | 184.3 ± 6.3 | 183.3 ± 4.1 | 42.8 ± 2.4 | 43.5 ± 1.9 | 149 ± 7.3 | 151.4 ± 5.9 | 0.92 ± 0.08 | 0.99 ± 0.09 | 27.1 ± 3.5 | 28.1 ± 2.9 | 30.3 ± 3.6 | 36.2 ± 2.8 |
| EM2 | 92 ±3.6 | 89.4 ± 2.0 | 187.8 ± 7.9 | 183.4 ± 3.8 | 43.5 ± 1.8 | 44.5 ± 1.4 | 150.5 ± 12.9 | 148.3 ± 9.0 | 0.93 ± 0.17 | 0.97 ± 0.12 | 28.9 ± 2.1 | 32.3 ± 2.4 | 38.6 ± 3.2 | 41.0 ± 1.8 |
| EM3 | 89.1 ± 3.2 | 88.5 ± 3.5 | 183.8 ± 4.1 | 180.5 ± 3.3 | 41.8 ± 1.4 | 43.8 ± 1.4 | 161.2 ± 11.6 | 155.6 ± 9.3 | 0.96 ± 0.06 | 1.14 ± 0.12 | 29.1 ± 2.5 | 33.4 ± 2.3 | 28.8 ± 3.2 | 34.5 ± 3.5 |
| EM4 | 88.6 ± 2.6 | 86.9 ± 2.9 | 186.4 ± 10.1 | 182.9 ± 3.5 | 44.5 ± 2.2 | 45.6 ± 1.9 | 160 ± 11.4 | 154.5 ± 4.2 | 0.89 ± 0.03 | 0.99 ± 0.07 | 27.3 ± 3.6 | 30.8 ± 4.5 | 32.1 ± 3.4 | 35.3 ± 4.9 |
| Valores normales | | | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 70 - 110 | | < 200 | | ≥ 40 | | < 200 | | 0.8 - 1.5 | | 17 - 59 | | 21 – 70 | |
| Femenino | 70 - 110 | | < 200 | | ≥ 40 | | < 200 | | 0.7 - 1.2 | | 14 - 36 | | 9.0 – 52 | |

Valores expresados como Media aritmética ± error estándar.

EP, Enalapril + placebo

EM2, Enalapril + 2 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM3, Enalapril + 3 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

EM4, Enalapril + 4 cápsulas de 500 mg de *Passiflora edulis*/día

5. DISCUSION

En la evaluación de la toxicidad de *Passiflora edulis*, la dosis letal media (DL₅₀) estimada tanto para el extracto etanólico de las hojas como para el jugo de *Passiflora edulis* supera ampliamente los 2000 mg/kg (tabla 3), que según las normas de la Comunidad Europea (⁵⁸), para la clasificación de la toxicidad aguda oral, se considera no clasificado (no tóxico).

Por otra parte, se observó que con dosis repetidas de extracto metanólico de las hojas durante 28 días, no hubo mortalidad ni síntomas tóxicos evidentes, además de no existir alteración alguna de parámetros físicos y de comportamiento evaluados. El peso corporal es un indicador de gran importancia pues está involucrado en una serie de cambios orgánicos en diferentes etapas de la vida, es por ello que una variación en su comportamiento sugiere algún efecto adverso de drogas o químicos y se considera significativa si hay una disminución de más del 10% del peso corporal inicial (⁵⁹). Este indicador, en este estudio tuvo un comportamiento normal de ganancia de peso y no se encontraron diferencias significativas (tabla 4, figuras 1 y 2).

Los exámenes hematológicos y de química sanguínea son de gran valor en los ensayos toxicológicos a largo plazo ya que los mismos son indicativos del alcance y profundidad de un daño, además los resultados alcanzados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico (⁶⁰). Los valores obtenidos en los indicadores hematológicos (tabla 5) no mostraron alteraciones importantes, las variaciones encontradas están dentro del rango establecido por el grupo control y por la literatura especializada (⁶¹). Sin embargo, dentro de los indicadores bioquímicos se observó un incremento leve en los valores de ALT, por encima del valor normal (tabla 6), lo cual podría indicar algún daño hepático. La enzima ALT es citosólica y se encuentra en concentraciones más altas en hepatocitos, de manera que el incremento en el suero podría ser debido a modificaciones de la permeabilidad transmembrana o daño celular, por eso es considerado como un indicador altamente sensible de hepatotoxicidad (⁶²).

El estudio microscópico del hígado reveló en un caso la presencia de microvesículas focal de hepatocitos y en otro caso infiltrado inflamatorio crónico mononuclear periportal focal y congestión vascular (figura 3B), lo cual guarda relación y podría ser la causa del leve incremento de los niveles séricos de ALT (tabla 6). Además en riñón se observó focos de necrosis tubular en 2 casos del total de diez animales tratados (figura 4B). Existe la posibilidad que las saponinas triterpenoidales presentes en las hojas de *P. edulis*, demostrado por Yoshikawa et al. ⁽¹⁷⁾ y confirmado en este estudio (tabla 1) puedan ser responsables del efecto sobre el hígado, ya que en una investigación toxicológica en la que la composición de la muestra fue principalmente saponinas triterpenoidales, se sugirió que éstas serían la causa del efecto tóxico sobre el hígado, posiblemente porque la mayoría de saponinas tienen una estructura química similar a las hormonas esteroides ⁽⁶³⁾, como es conocido el efecto hepatotóxico de los estrógenos ⁽⁶⁴⁾.

En Brazil, Maluf evaluó en ratas dos muestras de hojas de *P. edulis* en forma de extracto acuoso administrándoles por vía oral, una procedente de Estado de Sao Paulo y la otra de Río Grande do Norte; la primera lo hizo a 60 días y la segunda hasta 90 días, en la primera observó incremento de gama glutamil transpeptidasa (GGT) sérico (enzima que se eleva en enfermedades hepáticas colestásicas) y disminución del peso corporal; lo que no fue evidenciado con la muestra de Río Grande la que fue evaluada aún a mayor tiempo. El autor busca explicar sus hallazgos diciendo que el aumento de GGT podría ser por un fenómeno de inducción enzimática, y que los factores medio ambientales influyen en la variedad y cantidad de metabolitos secundarios que determinarían la variación de efectos encontrados en las muestras estudiadas de *P. edulis*. ⁽⁴⁴⁾. Si bien la presente investigación guarda cierta relación con los resultados obtenidos por Maluf, tratándose de estudios de corto plazo, se deberían ampliar los estudios de toxicidad crónica para aclarar el perfil toxicológico de esta planta, tal como lo sugieren los investigadores ^(44, 65).

Al evaluar la actividad antihipertensiva con el extracto etanólico de las hojas, el jugo del fruto, y la fracción metanólica de *Passiflora edulis* administrados por

vía oral en ratas, los resultados mostraron que la presión arterial sistólica (PAS) disminuyó significativamente en 14,1%, 17,0%, 16,8% y 26,4% para el extracto de hojas, jugo, fracción metanólica y captopril, respectivamente ($p < 0.01$), como se observa en la tabla 8; lo que concuerda con lo reportado por Ichimura al evaluar el extracto metanólico de la corteza de *P. edulis* y la luteolina en ratas con hipertensión espontánea (²¹).

Estudios que evaluaron actividad antihipertensiva con otras plantas usando modelos preclínicos con ratas hipertensas por L-NAME o espontáneamente, han confirmado esta propiedad. Así se ha demostrado con el extracto de la hoja de olivo (*Olea europaea*) en animales de experimentación, tanto por vía oral como intravenosa (⁶⁶); el ajo (*Alium sativum*) redujo la presión arterial en ratas hipertensas con ligadura de la arterial renal (⁶⁷); *Croton schiedeana*, *Curatella americana* y *Lupinus amandus* mostraron significativa actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (⁶⁸); el extracto acuoso-metanólico de las semillas de *Carum copticum* causó una caída de la presión arterial dependiente de la dosis en ratas anestesiadas (⁶⁹); el extracto de la raíz de *Stephaniae tetrandrae* retornó a sus niveles normales la presión arterial sanguínea en ratas hipertensas por acetato de deoxicorticosterona-sal (DOCA-sal) (⁷⁰). La medicina herbal japonesa Toki-shakuyaku-san mejoró la hipertensión y el retardo del crecimiento intrauterino en ratas con preeclampsia inducidas por L-NAME (⁷¹).

Los metabolitos secundarios de las plantas también han demostrado tener efecto antihipertensivo. En experimentos con ratas espontáneamente hipertensas, los polifenoles del té verde y té negro atenuaron el incremento de la presión arterial sanguínea, explicada en parte, por disminución de la expresión de cadenas ligeras de miosina fosforilada (⁷²); el flavonoide quercetina indujo una reducción significativa de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (⁷³); los flavonoides obtenidos de *Spergularia purpurea* también exhibieron acciones antihipertensivas (⁷⁴); además, el extracto rico en triterpenoides de bambú tuvo una notable actividad antihipertensiva (⁷⁵), un sesquiterpeno denominado S-Petasin extraído de la planta medicinal *Petasites formosanus* mostró acción hipotensiva por antagonismo directo del canal de

calcio tipo L ⁽⁷⁶⁾. Por otra parte, experimentos en anillos de aorta de rata han demostrado efecto vasorrelajante de diterpenoides aislados de *Croton schiedeianus* ⁽⁷⁷⁾, de triterpenoides (ácido oleanólico y eritrodiol) contenidos en el aceite de oliva ⁽⁷⁸⁾, de epigalo catequina-3-galato por inhibición, al menos en parte, de la actividad de las fosfodiesterasas ⁽⁷⁹⁾, y de eugenol que produce relajación del músculo liso vascular por bloqueo de canales de calcio sensibles a voltaje y los operados por receptor, que son modulados por óxido nítrico producido por el endotelio ⁽⁸⁰⁾.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una notable reducción en los niveles de óxido nítrico en el grupo que recibió el agente inhibidor de la óxido nítrico sintasa, N_G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), en comparación con el grupo que no recibió esta sustancia química (figura 9). Está claramente demostrado el rol que juega una alteración en la producción de óxido nítrico en el proceso hipertensivo ⁽⁸¹⁾. La hipertensión arterial inducida por L-NAME no sólo involucra la restricción de producción de óxido nítrico, sino también la activación del sistema nervioso simpático y la alteración del sistema renina-angiotensina, tal como incremento de la actividad de renina plasmática y de la concentración de angiotensina II o del número de receptores de angiotensina I ^(82, 83). En este modelo experimental, captopril, el fármaco de referencia, disminuyó la presión arterial de manera más efectiva que *Passiflora*. Este resultado confirma la eficiencia del tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) para prevenir la hipertensión en ratas con deficiencia de óxido nítrico ⁽⁵¹⁾.

El tratamiento con extracto metanólico de *P. edulis*, en dosis de 200 y 400 mg/kg, aumentaron significativamente los niveles de óxido nítrico, respecto del grupo L-NAME, de manera similar a captopril. Se ha demostrado que la disminución de presión arterial por los IECA se acompaña de un aumento de óxido nítrico por las células endoteliales ⁽⁸⁴⁾, y esto se ha observado también con los bloqueadores de los canales de calcio tipo L nifedipina y diltiazem ⁽⁸⁵⁾. El incremento de óxido nítrico podría explicar en parte el efecto antihipertensivo de *P. edulis*. Esto es relevante en la medida que el óxido nítrico es el principal factor relajante derivado del endotelio, mientras que el factor hiperpolarizante

derivado del endotelio también puede participar en la vasorelajación, especialmente en pequeñas arterias cuando está inhibida la formación de óxido nítrico, de esta manera el óxido nítrico juega un rol preponderante en la homeostasis de la presión sanguínea ya que un desbalance en la función vascular en la cual la contracción predomina sobre la relajación se cree es el rasgo patofisiológico principal de la hipertensión ⁽⁸⁶⁾.

Por otra parte, el óxido nítrico sirve como un regulador de la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial por retroalimentación negativa vía un proceso mediado por GMPc ⁽⁸⁷⁾, pero también puede activar directamente los canales de potasio dependientes de calcio en el músculo liso vascular, lo cual puede causar hiperpolarización y relajación del músculo liso vascular independientemente de GMPc ⁽⁸⁸⁾. Pero el óxido nítrico no sólo es importante en la vasorelajación, pues también hay clara evidencia que demuestra que previene la aterosclerosis experimental dado que reduce la adhesión y activación leucocitaria, migración de monocitos y la activación de células endoteliales por citokinas, e inhibe la proliferación de células de músculo liso y la adhesión y agregación plaquetaria ⁽⁸⁹⁾.

Los compuestos químicos de las plantas pueden tener la propiedad de incrementar la producción de óxido nítrico y a su vez puede ser de considerable interés en la prevención de hipertensión arterial. Los polifenoles indujeron vasorelajación dependiente del endotelio a través del incremento de la producción de óxido nítrico en aorta de rata ^(90, 91, 92, 93), así como en arteria coronaria porcina ⁽⁹⁴⁾; los flavonoides del jugo de uvas púrpuras incrementaron la liberación de óxido nítrico derivado de plaquetas y disminuyeron la producción de superóxido ⁽⁹⁵⁾. Asimismo, el flavonoide luteolina incrementó la actividad del promotor de la sintasa del óxido nítrico endotelial y la expresión del ARNm de sintasa del óxido nítrico endotelial, con el consecuente incremento de óxido nítrico ⁽⁹⁶⁾.

El efecto diurético del extracto metanólico de *P. edulis* queda demostrado en el presente estudio al obtener volúmenes de excreción urinaria en 24 horas, similares al de la furosemida (figura 6). Este resultado coincide con los valores

obtenidos al evaluar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las raíces de hinojo (*Foeniculum vulgare*) ⁽⁹⁷⁾, y de los extractos acuosos de cadillo (*Bidens alba*) y semillas de papaya (*Carica papaya*) ⁽⁹⁸⁾. El perfil diurético de *P. edulis* fue diferente, dado que el Volumen Minuto de Orina (VMO) para furosemida fue máximo en las primeras 2.5 h, mientras que el VMO para *P. edulis* se incrementó entre las 5-24 horas, evidenciando un efecto de inicio lento pero más prolongado (figura 7).

El efecto diurético también se ha demostrado experimentalmente con otras plantas como *Equisetum bogotense* (cola de caballo) ⁽⁹⁹⁾, *Fabiana patagonica* ⁽¹⁰⁰⁾, *Xanthium strumarium* ⁽¹⁰¹⁾, *Hibiscus sabdariffa* ⁽¹⁰²⁾, *Eruca sativa*, *Anethum graveolens* (eneldo) y *Daucus carota* (zanahoria) ⁽¹⁰³⁾, *Rossmarinus officinalis* (romero) ⁽⁵²⁾ y *Coriandrum sativum* (culantro) ⁽¹⁰⁴⁾.

La actividad diurética observada con *P. edulis* podría deberse a los flavonoides que contiene, toda vez que los flavonoides de *Spergularia purpurea* ⁽⁷⁴⁾ y el flavonoide crisina ⁽¹⁰⁵⁾ demostraron poseer este efecto. Se ha informado que los flavonoides tienen la propiedad de inhibir la enzima fosfodiesterasa, que destruye el AMPc por apertura de su anillo ⁽¹⁰⁶⁾. La inhibición de fosfodiesterasa conduce a un incremento del AMPc disponible, el cual activa una proteína fosfocinasa (PKA) que abre canales de agua por fosforilación, produciendo un aumento en el flujo de agua desde la sangre hasta la célula tubular renal, desde la cual puede escapar a la orina, y como consecuencia de la remoción de agua disminuye la presión sanguínea ⁽¹⁰⁷⁾.

En los últimos años, el interés en las propiedades antioxidantes y secuestradoras de radicales libres de las plantas y sus extractos han crecido enormemente por su importancia, especialmente de los polifenoles, en la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis, debido a que los grupos fenólicos en los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, por lo tanto rompiendo la cadena de reacciones de oxidación en los componentes celulares ⁽¹⁰⁸⁾.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo causa severa hipertensión arterial (^{109, 110}). Las especies reactivas del oxígeno pueden contribuir a la generación y/o mantenimiento de la hipertensión arterial por varios mecanismos que incluyen: inactivación de óxido nítrico derivado del endotelio, generación no enzimática de isoprostanos F₂ vasoconstrictores por peroxidación de ácido araquidónico y depleción del cofactor tetrahidrobiopterina de sintasa de óxido nítrico, comprobándose que la terapia antioxidante puede mejorar la hipertensión, disminuir la excreción urinaria de metabolitos de óxido nítrico y atenuar la regulación a la alta compensatoria de óxido nítrico sintasa (¹¹¹).

En este estudio, el extracto metanólico de *P. edulis* mostró actividad antioxidante con una CI₅₀ = 124 µg/mL (figura 10), semejante al flavonoide kaempferol para el cual se ha reportado una CI₅₀ = 120 µg/mL (¹¹²), y mejor que el vino tinto que se calculó una CI₅₀ = 42270 µg/mL (¹¹³). Giorgi et al., 2008 ha demostrado que la propiedad antioxidante de *Achillea collina* estuvo correlacionada significativamente con el contenido de fenoles totales (¹¹⁴). Los flavonoides como: rutina, dihidroquercetina, epigalo catequina-3-galato y quercetina fueron efectivos antioxidantes (¹¹⁵). Otras plantas medicinales mostraron buena actividad antioxidante, entre ellas: boldo (*Pneumus boldus*) (¹¹⁶), albahaca (*Ocimun basilicum*) (¹¹⁷), *Aloe saponaria* (¹¹⁸), Te verde (*Thea sinensis*) (¹¹⁹), apio (*Apium graveolens*) (¹²⁰), raíces de espárrago (*Asparagus racemosus*) (¹²¹), mostaza (*Brassica juncea*) (¹²²), menta (*Mentha piperita*) y té negro (*Camelia sinensis*) (¹²³), Geranio (*Pelargonium inquinans*) (¹²⁴), jugo de papaya (*Carica papaya*) (¹²⁵) y perejil (*Petroselinum crispum*) (¹²⁶).

Por otra parte, se ha demostrado que un incremento en la generación del radical libre anión superóxido en el endotelio vascular causa hipertensión arterial por modulación de las acciones vasodilatadoras del óxido nítrico (^{127, 128}). El anión superóxido y otras especies reactivas del oxígeno pueden oxidar al óxido nítrico a formas intermediarias más activas, tales como peroxinitrito, las cuales son capaces de producir nitrosilación y/o nitración tóxica de algunos residuos aminoácidos de proteínas tales como tirosina, produciendo inhibición de la producción de óxido nítrico y/o inactivación del óxido nítrico producido,

dañando la función endotelial (^{86, 129}). Al respecto, se ha encontrado que las plantas poseen la beneficiosa actividad secuestradora de peroxinitrito, como es el caso de *Curcuma longa* (¹³⁰), *Rosmarinus officinalis*, *Jasminum officinale*, *Salvia officinalis*, *Daucus carota*, *Tilia platiphyllos*, *Uncaria tomentosa* Wild, *Menta piperita*, etc (¹³¹); y dentro de los componentes fitoquímicos, los flavonoides como Baicalina, catequina, kaempferol, luteolina, quercetina y rutina tienen la propiedad de secuestrar peroxinitrito (¹³²) e incluso secuestrar al propio superóxido, además de inhibir varias enzimas responsables de la síntesis de anión superóxido (^{133, 134}). Probablemente la actividad antioxidante de *P. edulis* observada en este estudio se deba en parte a los flavonoides, dado que Ferreras et al., 2007 demostró que el extracto de las hojas de *P. edulis* tuvo actividad antioxidante y en esa muestra caracterizó 16 derivados de los flavonoides apigenina y luteolina (¹³⁵).

Los resultados del estudio clínico demostraron que la presión arterial disminuyó desde la primera semana de tratamiento hasta el final del experimento (tabla 11), debido a que todos los grupos recibieron enalapril, un conocido fármaco antihipertensivo que inhibe la enzima convertidora de angiotensina. Sin embargo, se observó una mejor reducción de la presión sanguínea por efecto del tratamiento combinado con el jugo liofilizado de *P. edulis*, y teniendo en cuenta que todos los grupos recibieron enalapril en la misma dosis, la reducción de la presión arterial respecto del grupo placebo se puede atribuir al efecto de *P. edulis*. Así la PAD y PAM disminuyeron significativamente desde la segunda semana de tratamiento con 4 cápsulas de 500 mg de *P. edulis*/día (EM4), en comparación con el grupo placebo (EP), tendencia que se mantuvo hasta la culminación del estudio (figura 11).

Otros estudios clínicos también han demostrado que las plantas y sus compuestos químicos pueden modular la presión arterial. En un estudio doble ciego controlado con placebo realizado en Irán, Asgary S, et al., 2000 demostró una significativa disminución de PAS y PAD por efecto del tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Achillea wilhelmsii*, lo cual fue atribuido al alto contenido de flavonoides de la planta (¹³⁶); el jugo de uva redujo significativamente la presión sistólica en 7,2 mmHg y la presión diastólica en

6,2 mmHg en 40 hombres koreanos hipertensos, también aquí se atribuyó a los flavonoides el mejoramiento de la función endotelial al incrementar la producción de óxido nítrico (¹³⁷); en un estudio clínico realizado en Francia y que incluyó 1286 mujeres, se demostró que el consumo de alimentos ricos en flavonoides estuvo inversamente relacionado con la presión sanguínea sistólica (¹³⁸); la fitoterapia con ajo (*Allium sativum*) en sujetos con hipertensión arterial primaria, solo disminuyó 3 mmHg la PAS y PAD en mujeres (¹³⁹); en un estudio con 40 gemelos monocigotos pre-hipertensos, el extracto de hoja olivo (*Olea europea*) disminuyó 6 mmHg la PAS y 5 mmHg la PAD (¹⁴⁰); la ingesta de chocolate oscuro redujo la PAS en 2.9 mmHg y la PAD 1.9 mmHg en 44 personas con pre-hipertensión alta e hipertensión arterial grado 1 (¹⁴¹).

Como se puede observar en estos pocos estudios clínicos publicados sobre actividad antihipertensiva de las plantas, la presión arterial disminuye menos de 10 mmHg. En nuestro estudio, la PAD disminuyó significativamente en 5.33 mmHg ($p < 0.05$) respecto al placebo, al final del experimento. A pesar que la PAS no disminuyó significativamente con el tratamiento con *P. edulis*, se produjo una reducción de 6,73 mmHg (grupo EM4) respecto del placebo, al final del experimento. Esto no deja de ser importante porque según el sexto reporte del JNC sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la presión sanguínea alta, del NIH de los EUA, estima que una disminución de 5 mmHg produciría una reducción en 14% de las muertes por apoplejía, un 9% de reducción de las muertes por enfermedad cardíaca, y un 7% de reducción en la mortalidad total (¹⁴²).

Durante el estudio, no se evidenciaron clínicamente efectos adversos como náuseas, vómitos, insomnio, mareos, alergia, etc. Solamente en un caso se presentó diarrea leve, pero no motivó la suspensión del tratamiento. Los valores de creatinina, transaminasa glutámica pirúvica y transaminasa glutámica oxalacética y de las demás pruebas realizadas, no mostraron alteración al final del experimento y se mantuvieron dentro de los parámetros considerados normales (tabla 12), lo que nos indica que el tratamiento con el jugo de *P. edulis* no produjo efectos adversos. Maluf et al., 1991 (⁴⁴) encontró que en un grupo de 9 sujetos sanos que recibieron liofilizado de extracto de la

hoja de *P. edulis*, los valores medios de GOT y amilasa estuvieron incrementados. Esto nos podría indicar que el jugo del fruto de *P. edulis*, a diferencia del extracto de las hojas, es más tolerable, toda vez que la DL₅₀ para el jugo fue mucho mayor que para las hojas (Tabla 2). Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de toxicidad crónica con el jugo para confirmar su seguridad y garantizar su uso en humanos.

Es probable que el efecto antihipertensivo de *P. edulis* demostrado en este estudio a nivel preclínico y clínico, se deba a las acciones combinadas de sus diferentes constituyentes químicos presentes tanto en las hojas como en el jugo del fruto. En el estudio fitoquímico preliminar demostramos la presencia de grupos fenólicos, en especial los flavonoides (Tabla 1), que confirma los hallazgos previos (^{16, 135}); estos compuestos contribuirían a reducir la presión arterial con sus propiedades diuréticas, antioxidantes, y vasorrelajantes por incremento de la producción de óxido nítrico. El eugenol (²⁷) y triterpenos (²¹) también podrían contribuir al efecto antihipertensivo. En el caso del jugo del fruto, la presencia de ácido ascórbico y caroteno en cantidades relativamente altas (²⁸), serían de mucha importancia para la actividad antioxidante y consecuentemente para el efecto antihipertensivo.

Considerando los resultados obtenidos, en las condiciones experimentales de nuestro estudio, *Passiflora edulis* mostró efecto antihipertensivo. Se necesitan estudios adicionales para establecer su seguridad y farmacocinética, así como del desarrollo de una formulación que conlleve a un fitomedicamento que contenga un extracto estandarizado de la planta..

6. CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico cualitativo indica la presencia de metabolitos secundarios teniendo en mayor cantidad los flavonoides seguido por otros metabolitos como taninos, quinonas y alcaloides; quienes serían los responsables de la bioactividad encontrada para el jugo del fruto y hojas de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá).
2. El estudio de seguridad de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá) contiene sustancias no tóxicas al mostrar en ratones una dosis letal 50 (DL50) de 10687 mg/kg y 21471 mg/kg para el extracto etanólico de la hojas y el jugo del fruto correspondientemente; y, en ratas el extracto metanólico de la hojas a dosis repetidas de 200 mg/kg durante 28 días no evidenció cambios hematológicos, bioquímicos e histopatológicos significativos.
3. El estudio pre-clínico ha demostrado eficacia antihipertensiva del extracto etanólico de las hojas, el jugo del fruto y la fracción metanólica del jugo del fruto de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá) en ratas con inducción de hipertensión arterial por L-NAME al reducir en un 14.1, 17.0 y 16.8% respectivamente las cifras elevadas de presión arterial sistólica.
4. El mecanismo de acción antihipertensivo del extracto etanólico de las hojas, el jugo del fruto y la fracción metanólica del jugo del fruto de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá) se explicaría por su efecto diurético, a la producción de óxido nítrico, y a un marcado efecto antioxidante.
5. El estudio clínico con el jugo liofilizado del fruto de *Passiflora edulis Sims* (maracuyá) formulado en cápsulas de 500 mg administrado por vía oral a pacientes con hipertensión estadio 1 ha demostrado que es un agente antihipertensivo eficaz al reducir en 6.73 mmHg y 5.33 mmHg la presión sistólica y la presión diastólica respectivamente en comparación al grupo placebo, y sin efectos adversos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wolf-Maier K, Cooper R, Banegas J, Giampaoli S, Hense H, Joffres M, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada and United States, JAMA. 2003;289:2363-2369.
2. Banegas JR. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. Hipertensión. 2005;22(9):353-362.
3. Organización Panamericana de la Salud (OPS). La Hipertensión Arterial como problema de salud comunitaria. Serie PALTEX 1984: 3.
4. Agusti R. Epidemiología de la hipertensión arterial en el Perú. Acta Med Per. 2006;23(2):69-75.
5. Katzung B. Farmacología Básica y Clínica. 8ª. Ed. México: El Manual Moderno. 2002. p. 181-210.
6. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: a review update. Journal of Ethnopharmacology, 2004; 94:1-23.
7. Jamir T, Sharma H, Dolui A. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. Fitoterapia. 1999; 70:395-401.
8. Desmarchelier C, Witting F. Setenta Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. 1ª ed. Lima: Gráfica Bellido. 2000. p. 187-190.
9. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Ed. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco-Perú. 1999. p. 368-370.
10. Natural Products Alert (NAPRALERT SM). Profile for *Passiflora edulis*. Chicago: The board of trustees of the University of Illinois. 2001.
11. Bombardelli E, Bonati A, Gabetta B, Martinelli E, Mustich G. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. Phytochemistry. 1975; 14(12): 2661-2665.
12. Mareck U, Herrmann K, Galensa R, Wray V. The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. Phytochemistry. 1991; 30(10): 3486-3487.
13. Seigler D, Pauli G, Nahrstedt A, Leen R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. Phytochemistry. 2002; 60(8):873-882.

14. Christensen J, Jaroszewski J. Natural glycosides containing allopyranose from the passion fruit plant circular dichroism of benzaldehyde cyanohydrin glycosides. *Org Lett*. 2001; 3(14):2193-2195.
15. Chassagne D, Crouzet J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruit. *Phytochemistry*. 1998; 49(3):757-759.
16. Slaytor M, McFarlane I. The biosynthesis and metabolism of harman in *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*. 1968; 7(4):605-611.
17. Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod*. 2000; 63(9):1229-1234.
18. Kidoy L, Nygard A, Andersen O, Pedersen A, Aksnes D, Kiremire B. Anthocyanins in Fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1997; 10(1):49-54.
19. Chassagne D, Crouzet J, Bayonove C, Brillout J, Baumes R. Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible *Passiflora* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1997; 45:2685–2689.
20. Pruthi J, Girdhari L. Chemical composition of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Sci. Food Agric*. 1959; 10:188-192.
21. Ichimura T, Yamanaka A, Ichiba T, Toyokawa T, Kamada Y, Tamamura T, Maruyama S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosc. Biotechnol. Biochem*. 2006;70(3):718-721.
22. Chobanian A, Bakris G, Black H, Cushman W, Green L, Izzo J, Jr., et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-72.
23. Gamboa R. Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Med Per*. 2006;23(2):76-82.
24. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach N, Eberlein K. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. *The Lancet* 1990;335:827-838.
25. Trilling J, Froom J. The urgent need to improve hypertension care. *Arch Fam Med* 2000;9:794-801.

26. García M. Guía Técnica: Cultivo de maracuyá amarillo. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. 2002:80-85.
27. Centro Experimental "Dr. Jesús Aguilar Paz". El Cultivo de maracuyá (*Passiflora Edulis* Sims). Honduras. 2002.
28. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Costa Rica: Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. 1991:30-32.
29. Galindo F, Villavicencio M. Maracuyá. Seminario de Agronegocios. Lima: Universidad del Pacífico. 2000.
30. Puricelli L, Dell'Aica I, Sartor L, Garbisa S, Caniato R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia*. 2003 ; 74(3) :302-304.
31. Rowe C, Nantz M, Deniera C, Green K, Talcott S, Percival S. Inhibition of neoplastic transformation of benzo[alpha]pyrene-treated BALB/c 3T3 murine cells by a phytochemical extract of passionfruit juice. *J Med Food*. 2004;7(4):402-407.
32. Gonçalves A, Martins O, Ligocki A, Tâmbara R, De Almeida C, Arnulf T, et al. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21 (Supl. 2):3-8.
33. Vargas A, Geremias D, Provensi G, Fornari P, Reginatto F, Gosmann G, et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia*. 2007;78(2):112-119.
34. Montanher A, Zucolotto S, Schenkel E, Fröde T. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharmacol*. 2007; 109(2):281-288.
35. Ngo E, Ngahb E, Ekoundic C, Dongc C, Ayissi R, Rakotonirinac S, et al. Sedative and anticonvulsant properties of *passiflora edulis* dried leaves decoction in mice. *Afr. J. Trad. CAM*. 2004;1:63-71.
36. Müller V, Chávez J, Reginatto F, Zucolotto S, Niero S, Navarro D, et al. Evaluation of Antiviral Activity of South American Plant Extracts Against

Herpes Simplex Virus Type 1 and Rabies Virus. *Phytother. Res.* 2007; 21:970–974.

37. Pelegrini P, Noronha E, Muniz M, Vasconcelos I, Chiarello M, Oliveira J, et al. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1764(6):1141-1146.
38. Petry R, Reginatto F, de-Paris F, Gosmann G, Salgueiro J, Quevedo J, et al. Comparative Pharmacological Study of Hydroethanol Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Leaves. *Phytother. Res.* 2001;15:162–164.
39. Reginatto F, De-Paris F, Petra R, Quevedo J, González G, Gosmann G, et al. Evaluation of Anxiolytic Activity of Spray Dried Powders of Two South Brazilian *Passiflora* species. *Phytother. Res.* 2006; 20:348–351.
40. Coleta M, Batista M, Campos M, Carvalho R, Cotrim M, De Lima T, et al. Neuropharmacological Evaluation of the Putative Anxiolytic Effects of *Passiflora edulis* Sims, its Sub-fractions and Flavonoid Constituents. *Phytother. Res.* 2006; 20:1067–1073.
41. Barbosa P, Valvassori S, Bordignon C, Kappel V, Martins M, Gavioli E, et al. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce Anxiety-Related Behaviors Without Affecting Memory Process in Rats. *J Med Food* 2008;11(2):282–288.
42. Bruschi M, Cardoso M, Milani H. Avaliação farmacológica de um extrato de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa. *Rev. Ciênc. Farm.* 2002 ; 23(2) :263-276.
43. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia.* 2001;72:698-702.
44. Maluf E, Barros M, Frochtengarten M, Benti R, Leite J. Assessment of the Hypnotic/Sedative Effects and Toxicity of *Passiflora edulis* Aqueous Extract in Rodents and Humans. *Phytother. Res.* 1991; 5:262-266.
45. Sharapin N, Machado L, Rocha L, Pinzón R. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. CYTED-Convenio Andrés Bello. 2000:22-23.

46. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación; 1995. p. 220.
47. Domínguez A. Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa Edición 1973:11-115.
48. Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Lima: Editorial Fondo Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.
49. Vega R, Carrillo C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). *Rev Cubana Plant Med.* 1997; 2(2-3): 14-18.
50. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 1995, N° 47 [serie en Internet]. [citado 15 May 2008]. Disponible en: <http://www.oecd.org>
51. Pereira L, Bezerra D, Mandarim-de-Lacerda C. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathology Research and Practice.* 2004; 200:211-217.
52. Martínez S, Paz J, Corral A, Martínez C. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. *Rev Cubana Plant Med* [periódico en la Internet]. 2004 Abr [citado 2008 Jul 15]; 9(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000100007&lng=es&nrm=iso.
53. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna, P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, and Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chem. Acta*, 1998; 274: 177–188.
54. Chang S, Wu J, Wang S, Kang P, Yang N, Shyur L. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3420–3424.
55. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press;1996.
56. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. 54ª Asamblea General de la AMM, Tokio. 2004.

57. European Medicines Agency. Guideline for Good Clinical Practice. ICH Harmonised Tripartite Guideline. CPMP/ICH/135/95. London, 2002.
58. Unión Europea. Decisión 2000/368/CE de la Comisión: aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. Diario Oficial. 2000; L136:108-125.
59. Ramesh T, Lee K, Lee H, Kim S. Acute oral toxicity study of *Asiasari radix* extract in mice. *International Journal of Toxicology*, 2007;26:247-251.
60. González Y, Scull I, Bada Ana, Fuentes D, González B, Arteaga M, et al. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med* [periódico en la Internet]. 2006 Jun [citado 2008 Jul 15]; 11(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200005&lng=es&nrm=iso.
61. Wolford S, Schroer R, Gohs F, Gallo P, Brodeck M, Falk H, et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environm Health* 1986;18: 161-188.
62. Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M.. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol* 2002;83:209-217.
63. Burgos R, Hancke J, Wikman G. Toxicological Assessment of *Aralia mandshurica* (Araliaceae) Root Extract after Subchronic Administration in Rats. A Biochemical and Histological Study. *Phytother Res*. 1994;8:1-9.
64. Yamamoto Y, Moore R, Hess H, Guo G, Gonzalez F, Korach K, et al. Estrogen Receptor α Mediates 17 α -Ethinylestradiol Causing Hepatotoxicity. *Journal Biol. Chem*. 2006;281(24):16625-16631.
65. Zibadi S, Watson R. Passion Fruit (*Passiflora edulis*): Composition, Efficacy and Safety. *Evidence-Based Integrative Medicine*. 2004;1(3):183-187.
66. Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, González M, Utrilla M. Vasodilatador effect of olive leaf. *Planta Med*. 1991; 57: 417-419.
67. Al-Qattan K, Khan I, Alnaqeeb M, Ali M. Mechanism of garlic (*Allium sativum*) induced reduction of hypertension in 2K-1C rats: a possible

mediation of Na/H exchanger isoform-1. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2003;69:217-222.

68. Guerrero M, Puebla P, Carrón R, Martín M, Arteaga L, San Román L. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2002; 80:37-42.
69. Gilani A, Jabee Q, Ghayur M, Jabanz K, Akhtar M. Studies on the antihypertensive, antispasmodic, bronchodilator and hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. Journal of Ethnopharmacology. 2005;98:127-135.
70. Yu X, Wu S, Chen C, Pang K, Wong T. Antihypertensive and anti-arrhythmic effects of an extract of Radix Stephaniae tetrandrae in the rat. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2004;56:115-122.
71. Takei H, Nakai Y, Hattori N, Yamamoto M, Kurauchi K, Sasaki H, Aburada M. The herbal medicine Toki-shakayaku-san improves the hypertension and intrauterine growth retardation in preeclampsia rats induced by N^ω-nitro-L-arginine methyl ester. Phytomedicine. 2004;11:43-50.
72. Negishi H, Xi J, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J. Nutr. 2004; 134: 38-42.
73. Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete M, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. British Journal of Pharmacology. 2001;133:117-124.
74. Jouad H, Lacaille-Dubois M, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 76: 159-163.
75. Jiao J, Zhang Y, Lou D, Wu X, Zhang Y. Antihyperlipidemic and Antihypertensive Effect of a Triterpenoid-Rich Extract from Bamboo Shavings and Vasodilator Effect of Friedelin on Phenylephrine-induced Vasoconstriction in Thoracic Aortas of Rats. *Phytother. Res.* 2007;21:1135-1141.

76. Wang G, Shum A, Lin Y, Liao J, Wu X, Ren J, et al. Calcium Channel Blockade in Vascular Smooth Muscle Cells: Major Hypotensive Mechanism of S-Petasin, a Hypotensive Sesquiterpene from *Petasites formosanus*. *JPET* 2001;297:240-246.
77. Guerrero M, Puebla P, Carrón R, Martín M, San Román L. Vasorelaxant effect of new *neo-clerodane* diterpenoids isolated from *Croton schiedeana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;94:185-189.
78. Rodríguez R, Dolores M, Perona J, Ruiz V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition*. 2004;92:635-642.
79. Alvarez E, Campos M, Justiniano H, Lugnier C, Orallo F. Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 2006(147):269-280.
80. Nolf C, Venturini L, Valentim D. Vasorelaxant effects of eugenol on thoracic aorta. *Vascular Pharmacology*. 2003; 40:59-66.
81. Mokuno S, Ito T, Numaguchi Y, Matsui H, Toki Y, Okumura K, et al. Impaired nitric oxide production and enhanced autoregulation of coronary circulation in young spontaneously hypertensive rats at prehypertensive stage. *Hypertens. Res*. 2001; 24:395-401.
82. Bernátová I, Pechánova O, Kristek F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term N^G-nitro-L-arginine methyl ester treatment. *Jpn J Pharmacol*. 1999; 81:99-106.
83. Nakata T, Takeda K, Harada S, Oguni A, Hatta T, Kawa T, et al. Role of the central nervous system in the development of hypertension produced by chronic nitric oxide blockade in rats. *Hypertens. Res*. 2001; 24:39-45.
84. Hatta T, Nakata T, Harada S, Kiyama M, Moriguchi J, Morimoto S, et al. Lowering of Blood Pressure Improves Endothelial Dysfunction by Increase of Nitric Oxide Production in Hypertensive Rats. *Hypertens Res*. 2002; 25: 455-460.
85. Ding Y, Vaziri N. Nifedipine and Diltiazem but Not Verapamil Up-Regulate Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. *JPET*. 2000;292:606-609.

86. Achike F, Kwan C. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2003; 30:605-615.
87. Vaziri N, Wang X. cGMP-Mediated Negative-Feedback Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Nitric Oxide. *Hypertension*. 1999;34(6):1237-1245.
88. Bolotina V, Najibi S, Palacino J, Pagano P, Cohen R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368:850-853.
89. Da Luz P, Coimbra S. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37:1275-1295.
90. Andriambelosom E, Kleschyov A, Muller B, Beretz A, Stoclet J, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Brit J Pharmacology*. 1997;120:1053-1058.
91. Andriambeloson E, Magnier C. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition*. 1998; 128(12):2324-2334.
92. Benito S, Lopez D, Sáiz M, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila M. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British journal of Pharmacology*. 2002; 135:910-916.
93. Nakamura Y, Matsumoto H, Todoki K. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrates in rat thoracic aorta. *Jpn. J. Pharmacol*. 2002; 89: 29-35.
94. Taubert D, Berkels R, Klaus W, Roesen R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: Essential structural features. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2002; 40: 701-713.
95. Freedman J, Parker C, Li L, Perlman J, Ivanov V, Deak L. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001; 103:2792-2798.
96. Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Forstermann U. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) upregulate endothelial-type nitric-oxide synthase

gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Experiment Ther.*2004; 310(3):926-932.

97. Beaux D, Fleurentin J, Mortier F. Diuretic Action of Hydroalcohol Extracts of *Foeniculum vulgare* var dulce (D.C.) Roots in Rats. *Phytother. Res.* 1997;11:320-322.
98. Lorenzo G, Boffill M, Monteagudo E, Yamilet M, Romero D, Del Castillo L. Evaluación preliminar de la actividad diurética de *Bidens alba* L y *Carica papaya* L. *Medicentro* 2003;7(1). Disponible en internet: bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILA CS&lang
99. Rodriguez J, Pacheco P, Razmilic I, Loyola J, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C. Hypotensive and Diuretic Effect of *Equisetum bogotense* and *Fuchsia magellanica* and Micropropagation of *E. bogotense*. *Phytother Res.* 1994;8:157-160.
100. Alvarez M, María A, Saad J. Diuretic Activity of *Fabiana patagonica* in Rats. *Phytother. Res.* 2002;16:71-73.
101. Jiménez L, León M, Herrera R, García G, Cadenas J. Efecto diurético del *Xanthium strumarium* L. (Guizajo de caballo). *Rev Cubana Plant Med* 1999;1(4):22-25.
102. Márquez R, De la Rosa, Rivero C, Medina M. Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad Wistar. *Scientia et Technica* 2007;3(33):377-381.
103. Mahran G, Kadry H, Isaac Z, Thabett C, Al-Azizi M, El-Olemy M. Investigation of Diuretic Drug Plants. Phytochemical Screening and Pharmacological Evaluation of *Anethum graveolens* L., *Apium graveolens* L., *Daucus carota* L. and *Eruca sativa* Mill. *Phytother. Res.* 1991;5:169-172.
104. Aissaoui A, El-Hilaly J, Israili Z, Lyoussi B. Acute diuretic effect of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. in anesthetized rats. *J Ethnopharmacol.* 2008;115(1):89-95.
105. Cherkaoui-Tangi K, Lachkar M, Wibo M, Morel N, Gilani A, Lyoussi B. Pharmacological Studies on Hypotensive, Diuretic and Vasodilator

Activities of Chrysin Glucoside from *Calycotome villosa* in Rats. *Phytother. Res.* 2008;22:356-361.

106. Ko W, Shih Ch, Lai Y, Chen J, Huang H. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:2087-94.
107. Havsteen H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics.* 2002;96:67– 202.
108. Scalvert A, Manach C, Morand C, Rémesi C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2005;45:287–306.
109. Vaziri N, Wang X, Oveisi F, Rad B. Induction of Oxidative Stress by Glutathione Depletion Causes Severe Hypertension in Normal Rats. *Hypertension.* 2000;36:142-146.
110. Fortepiani L, Reckelhoff J. Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension.* 2005;23(4):801-805.
111. Vaziri N, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs D. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hipertensión.* 2000; 36:957-964.
112. De Beck P, Cartier G, David B, Dijoux M, Mariotte A. Antioxidant Flavonoids and Phenolic Acids from Leaves of *Leea guineense* G. Don (Leeaceae). *Phytother. Res.* 2003;17:345-347.
113. Fernández A, Muñoz A, Cambillo E, Ramos F, Ortiz C. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta Med Per* 2007;24(3):145-152.
114. Giorgi A, Bombelli R, Luini A, Speranza G, Cosentino M, Lecchini S, et al. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Infusions from Leaves and Inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rchb. *Phytother. Res.* 2008. disponible en internet [Citado el 20 de enero de 2009] en: www.interscience.wiley.com
115. Potapovich A, Kostyuk V. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids. *Biochemistry (Moscow).* 2003; 68(5):514-519.

116. Schmeda G, Rodríguez J, Theodulo C, Astudillo S, Feresin G, Tapia A. Free-radical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radical Research*. 2003;37(4):447-452.
117. Gülçin I, Elmastat M, Aboul-Enein H. Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. *Phytother. Res*. 2007;21:354-361.
118. Yoo E, Kim S, Lee W, Park H, Kim S, Cho J, et al. Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aloe saponaria* Haw. *Phytother. Res*. 2008;22:1389-1395.
119. Fournau C, Laurens A, Hocquemiller R, CavC A. Radical Scavenging Evaluation of Green Tea Extracts. *Phytother. Res*. 1996;10:529-530.
120. Popovic M, Kaurinovic B, Trivic S, Mimica-Dukic M, Bursa M. Effect of Celery (*Apium graveolens*) Extracts on Some Biochemical Parameters of Oxidative Stress in Mice Treated with Carbon Tetrachloride. *Phytother. Res*. 2006;20:531-537.
121. Wiboonpun N, Phuwapraisirisan P, Tip-pyang S. Identification of Antioxidant Compound from *Asparagus racemosus*. *Phytother. Res*. 2004;18:771-773.
122. Kim H, Yokozawa T, Cho E, Cheigh H, Choi J, Chung H. In Vitro and in Vivo Antioxidant Effects of Mustard Leaf (*Brassica juncea*). *Phytother. Res*. 2003;17: 465-471.
123. Szabo M, Mester M, Chambre D, Idioiu C, Jianu I. DPPH analysis for antioxidant effect of mint, bilberry and black tea, aqueous extracts. *Scien. and Techn. Bull. of Univ. A. Vlaicu Arad* 2006;11(12):117-121.
124. Piao X, Piao XL, Kim H, Cho E. Antioxidative Activity of Geranium (*Pelargonium inquinans* Ait) and its Active Component, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -Dglucose. *Phytother. Res*. 2008;22:534-538.
125. Mehdipour S, Yasa N, Dehghan G, Khorasani R, Mohammadirad A, Rahimi R, et al. Antioxidant Potentials of Iranian *Carica papaya* juice *in vitro* and *in vivo* are Comparable to α -Tocopherol. *Phytother. Res*. 2006;20:591-594.
126. Popovic M, Kaurinovic B, Jakovljevic V, Mimica-Dukic M, Bursa M. Effect of Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill, Apiaceae)

Extracts on some Biochemical Parameters of Oxidative Stress in Mice treated with CCl₄. *Phytother. Res.* 2007;21:717-723.

127. Kerr S, Brosnan M, McIntire M, Reid J, Dominiczak A, Hamilton C. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hipertensión: role of the endothelium. *Hipertensión*. 1999; 33(6):1353-1358.
128. Tai M, Wang L, Wu K, Chan J. Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005;38:450- 462.
129. Gryglewski R, Palmer R, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320:454-456.
130. Kim J, Kim A, Chung H, Han S, Kim B, Choi J. *In Vitro* Peroxynitrite Scavenging Activity of Diarylheptanoids from *Curcuma longa*. *Phytother. Res.* 2003;17:481-484.
131. Choi H, Choi J, Han Y, Bae S, Chung H. Peroxynitrite Scavenging Activity of Herb Extracts. *Phytother. Res.* 2002;16:364-367.
132. Choi J, Chung H, Kang S, Jung M, Kim J, Kyung J, et al. The Structure–Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother. Res.* 2002;16:232-235.
133. Woodman O, Chan E. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004; 31:786-790.
134. Nijveldt R, Nood E, Hoorn D, Boelens P, Norren K, Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:418-425.
135. Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Andrade P, Seabra R, Gil-Izquierdo A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *J Agric Food Chem*. 2007;55(25):10187-10193.
136. Asgary S, Naderi G, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Mostafavi S, Vaskili R. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs Exp Clin Res*. 2000;26(3):89-93.

137. Park Y, Kim J, Kang M. Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: Double-blind, placebo controlled intervention trial. *BioFactors*. 2004;22:145-147.
138. Mennen L, Saphinho D, De Bree A, Arnault N, Bertrais S, Galan P, et al. Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreases cardiovascular risk in apparently healthy French women. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(4):923-926.
139. Duda G, Suliburska J, Pupek-Musialik D. Effects of short-term garlic supplementation on lipid metabolism and antioxidant status in hypertensive adults. *Pharmacological Reports*. 2008;60:163-170.
140. Perrinjaquet-Moccetti¹ T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Brad B, Aydogan C. Food Supplementation with an Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Reduces Blood Pressure in Borderline Hypertensive Monozygotic Twins. *Phytother. Res*. 2008;22:1239-1242.
141. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schöming E. Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide. *JAMA*. 2007;298(1):49-60.
142. NIH. Publication N°. 98-4080, The 6th Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, Nov 1997.

8. ANEXO

Tabla 13. Clasificación de la presión sanguínea para adultos

| Clasificación de la presión sanguínea | Presión sanguínea sistólica (mmHg) | Presión sanguínea diastólica (mmHg) |
|--|---|--|
| Normal | < 120 | y < 80 |
| Prehipertensión | 120-139 | o 80-89 |
| Hipertensión estadio 1 | 140-159 | o 90-99 |
| Hipertensión estadio 1 | ≥ 160 | o ≥ 100 |

Fuente: Chobanian A, Bakris G, Black H, Cushman W, Green L, Izzo J, Jr., et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-72.⁽²²⁾

Tabla 14. Estudios clínicos comparativos sobre actividad antihipertensiva realizados con plantas medicinales en el periodo 2004-2009.

| Autor | País | Año | Muestra | ↓PAS/PAD (mmHg) |
|--------------|----------|------|------------------------------------|--------------------|
| Park | Korea | 2004 | Jugo de uva | 7.2/6.2 |
| Mennen | Francia | 2004 | Alimentos ricos en flavonoides | 2/ |
| Duda | Polonia | 2008 | Ajo (<i>Allium sativum</i>) | 3/3 |
| Perrinjaquet | Alemania | 2008 | Extracto de hoja de olivo | 6/5 |
| Taubert | Alemania | 2007 | Chocolate oscuro | 2.9/1.9 |
| Rojas | Perú | 2009 | Jugo del fruto de <i>P. edulis</i> | 6.7/5.3 |

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica